

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Reactivación del ciclo celular en neuronas y  
disfunción sináptica: un nuevo concepto en la  
enfermedad de Alzheimer**

Tesis Doctoral

ESTÍBALIZ BARRIO ALONSO

Licenciada en Biotecnología

Director

DR. JOSÉ MARÍA FRADE LÓPEZ

Instituto Cajal (CSIC)

En portada, dibujo en acuarelas de una red neuronal realizados por la autora.

<<Lo único que necesitamos para  
convertirnos en buenos filósofos  
es la capacidad de asombro>>

Jostein Gaarder, *El mundo de Sofía*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director de tesis, Jose, por haberme dado la oportunidad de participar en un proyecto tan interesante, por ayudarme a formarme como científica y por confiar en mí.

En el plano profesional, que al final inevitablemente se convierte en el personal, me gustaría agradecer a todas aquellas personas del Instituto Cajal que me han acompañado estos cuatro años. Quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio por ayudarme a crecer como persona y científica. Muchas gracias Alberto por tu paciencia, generosidad y compañerismo. A Chaska, por haberme enseñado tantas cosas y ayudarme a descubrir la importancia de la independencia y la “buena” ciencia. Y a María José, gracias por todo el soporte físico y emocional, por todos los desayunos y conversaciones. Porque hemos aprendido innumerables cosas juntas y por ello podemos decir que estamos definitivamente *in* y “en la cresta de la ola”. De mi laboratorio hermano, tengo que agradecer a Eva Díaz por sus sabios consejos y ejemplo de perfección y profesionalidad. A Esther, Maku y Pablo, por su interés y compañía. A Cagla por estar siempre dispuesta a echar una mano y por compartir tu manera de ver el mundo. Y por supuesto a mi Eva. Gracias por todos los momentos en los que nos hemos aguantado y sujetado la una a la otra, por alegrarme cada día con tu insaciable energía y por enseñarme tantas cosas durante este tiempo. Gracias por ayudarme a soltar un poco mi melena. Del Cajal no se me puede olvidar agradecer a Guille, Samuel, Lorena, Noelia, Sonia, Marieta, Alberto, Iván, Elena, Raquel, Paloma, Ángel, Anna...Gracias a Óscar por su paciencia y generosidad enseñándome a inyectar. Gracias infinitas a María por su generosidad cuando las épocas oscuras en cultivos acontecían. A Carol, gracias por tu buena onda y cariño, eres un ejemplo de luchadora. A Ali, por todo tu esfuerzo y compromiso, acompañado siempre con una sonrisa. No podría haber tenido más suerte en una compañera para los registros electrofisiológicos. Asimismo, me gustaría hacer especial mención a Carmen y Belén, responsables del servicio de Imagen del Instituto, por su profesionalidad y compromiso. Gracias por todo el trabajo duro para la realización de las *macros*, claves para el análisis de muchos de los datos que recoge este trabajo. Gracias a todos los compañeros de Administración, en especial a Pepa y Ana, que siempre me han acogido con una sonrisa. Gracias a la Doctora Gertrudis Perea por darme la oportunidad de completar este trabajo con datos electrofisiológicos, sin los cuales esta investigación se habría quedado más coja. Gracias al Doctor Luis Barrios por sus consejos y conversaciones, las cuales siempre inspiran ilusión y motivación. Y muchas gracias al Doctor Eduardo Martín por ser un mentor en mis primeros pasos en la electrofisiología, por su paciencia, por avivar mi curiosidad e inspirarme a abrir mis conocimientos. Por último, de mi anterior laboratorio



me gustaría agradecer a la Doctora Ángeles Martín por acogerme en mis primeros pasos en la investigación y mostrarme lo que podía llegar a ser. Gracias infinitas a Carol y Noemí por todo el tiempo que emplearon en enseñarme las bases en las que luego he sustentado mi entusiasmo y ética de trabajo.

Por otro lado, muchas gracias a todos mis tí@s y prim@s por estar pendiente de mis progresos. A mi tía Juana por su asesoramiento artístico para los dibujos con acuarelas. A mi primo Mauro por estar siempre interesado de que te diese la plasta con mis neuronas. Y en especial a mi prima Bárbara y a mi tía María (la bióloga). A Bárbara, muchas gracias por estar ahí por mí siempre, por hacerme reír hasta llorar, por todas las meriendas en el VIPS y *escape rooms*. Esas neuronas que contaste te dan la mención universal en Neurociencia. Y a mi tía María, gracias, porque siempre te has tomado esta tesis como tuya y me has demostrado tu amor e interés en cada paso. Un trocito de esta tesis va para vosotras también.

Me gustaría agradecer a mis amigos y amigas (las/los de siempre y las nuevas incorporaciones) por su interés y apoyo: Belén, Martín, Jaime, David, Sofía, María, Silvia, María, Laura, Pitu, Suso, Juan, Bea, Miryam, Ángel... A Bergel, gracias, por todos nuestros viajes ida y vuelta a Madrid por las mañanas y nuestras conversaciones *hater* y filosóficas, siempre me has ayudado a mirar las cosas con perspectiva. A Sara, por ser mi refugio en lo bueno y en lo malo, por entenderme de manera especial, gracias, y por nuestros planes para dominar el mundo. A Irene, por tu esfuerzo por sacarme siempre una sonrisa y ayudarme a crecer como persona. Gracias por ser mi compañera de viaje vital. Y a Julia, por ser *mi persona* durante todos estos años y mi apoyo compartiendo todos y cada uno de los detalles. Gracias por ser mi soporte y seguir caminando de la mano conmigo. A Johnny, gracias por tu apoyo y compañía siempre con un toque musical. Esta investigación y todas las venideras son por y para tu angelito.

Asimismo querría mencionar a todas aquellas personas que alguna vez creyeron en mí. En concreto a todos los maestros y profesores que tuvieron la generosidad de proporcionarme las herramientas para llegar a donde quisiera. A Eusebio, Dora y, en especial, a Juan. Sé que de haber estado aquí serías de los primeros en tener un ejemplar de este trabajo. A Juani y Esther por su interés más sincero y admiración desproporcionada. Thanks Daniela for your genuine curiosity, unconditional support and outstanding knowledge of the human being.

A Patri. Muchas gracias por ser mi “post-doc” en la sombra, por tu generosidad en compartir tus conocimientos y por tener una ética de trabajo admirable. Por tu esfuerzo en

ayudarme perfeccionar este manuscrito final. Me has enseñado cosas no cuantificables en este último año y por ello, y por ti, estoy tremendamente agradecida.

A Manu. Gracias por tu apabullante generosidad. Gracias por prestarme tu ayuda desinteresada con pequeñas cosas como la estadística, hasta desarrollar el modelo de red neuronal que se presenta en este trabajo. Por tu capacidad de trabajo e inquebrantable compromiso. Por ser mi compañero clave en esta última etapa y por ayudarme, figurativa y literalmente, a escribir los dos últimos párrafos de esta tesis. Porque nuestros cometas hayan colisionado, estoy infinitamente agradecida.

Antes de comenzar la tesis mucha gente me advirtió del vertiginoso y frustrante camino que iba a emprender. Y sin embargo, como otras muchas personas, me animé a recorrerlo. Tan solo se necesitaba curiosidad y trabajo duro, cualidades que, precisamente, me han enseñado muy bien mis padres. Porque ellos han sido siempre un ejemplo de trabajo, constancia y profesionalidad. Me gustaría agradecerles por todo el sacrificio de todos estos años para darnos, a mi hermana y a mí, lo mejor y más. Gracias infinitas.

A mi madre, gracias por todas esas horas incontables a las tantas de la noche preguntándome la lección o escuchándome las charlas que tenía que dar. Se puede decir que, además de ser conocedora de qué es una neurona, gran parte de este humilde mérito es tuyo. Por ayudarme a ser mejor y llevarme de la mano siempre.

A mi padre, gracias por ser el primero en imprimir y colgar en el frigorífico una copia de mi *paper*. Y por, para más inri, imprimirme una copia traducida al castellano con el *Google traductor*. Por todos los “Llego a las XX:XX a la estación, please”. Por creer incondicionalmente en mí y demostrármelo todos los días, gracias.

A mi hermana Celia, por ser capaz de leerme la mente y decirme que no me agobiase con tan solo un suspiro mío. Por intercambiar roles de mayor-pequeña y cuidarme cuando lo he necesitado. Siempre estás a mi lado (como una lapa literalmente) en todos aquellos momentos en los que me había puesto unas gafas de sol demasiado opacas y no veía bien la luz. Estoy muy orgullosa de la mujer fuerte en la que te has convertido... *I mean, I'm cute, but you're amazing.*

Quisiera hacer especial mención a mi abuela Julita, por tomar mis penas y logros como suyos. Por alimentarme “como Dios manda” con su comida y su amor incondicional. Por preguntarme con adoración siempre qué tal iba, aun sabiendo que no iba a entender las palabras que saliesen de mi boca si le explicase. Millones de gracias. También gracias a mi abuela Concha, que aunque no pueda asistir al final de esta etapa, sé que siempre ha estado muy orgullosa de su “fea”. Esta tesis se la dedico a ellas.

## RESUMEN

La reentrada en ciclo celular en neuronas y la disfuncionalidad sináptica son dos eventos observados en las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD). La existencia de mecanismos moleculares compartidos entre ambos procesos sugiere una fuerte conexión entre el control del ciclo celular en neuronas “postmitóticas” y la regulación de la actividad y plasticidad sináptica, pudiendo ser la desregulación de ambos eventos clave para el desarrollo la patología. Con objeto de explorar esta cuestión, en este trabajo se presenta un modelo *in vitro* en el que se reactiva el ciclo en neuronas corticales mediante la expresión del antígeno T del SV40. La reactivación de ciclo derivó en hiperploidez de las neuronas, las cuales sufrieron una muerte progresiva y retardada, tal y como se ha observado en neuronas con contenido mayor al diploide en AD. Aquellas neuronas que reactivaron la maquinaria de ciclo presentaron una disminución en la frecuencia de generación de potenciales de acción, así como una menor actividad espontánea, siendo perfiles que correlacionan con una pérdida progresiva del segmento inicial del axón y de densidad de la proteína estructural PSD-95. La despolarización de la membrana en presencia de alto potasio fue capaz de mantener la densidad de PSD-95 y recuperar parcialmente la actividad sináptica espontánea, así como prevenir la muerte neuronal. En conjunto, los resultados sugieren la capacidad de las neuronas que han reentrado en ciclo de mantenerse integradas en circuitos activos a pesar de no ser funcionalmente activas. Para testar el impacto funcional de esta hipótesis, se desarrolló un modelo *in silico* de red neuronal en el que se observó cómo la presencia de neuronas hiperploides es capaz de alterar diferencialmente la frecuencia de disparo en distintas poblaciones y las oscilaciones generadas. Con todo ello, el presente trabajo propone que la reentrada en ciclo en neuronas diferenciadas podría contribuir a la deficiencia cognitiva presente en los primeros estadios de AD así como a la vulnerabilidad de degeneración en las últimas etapas.

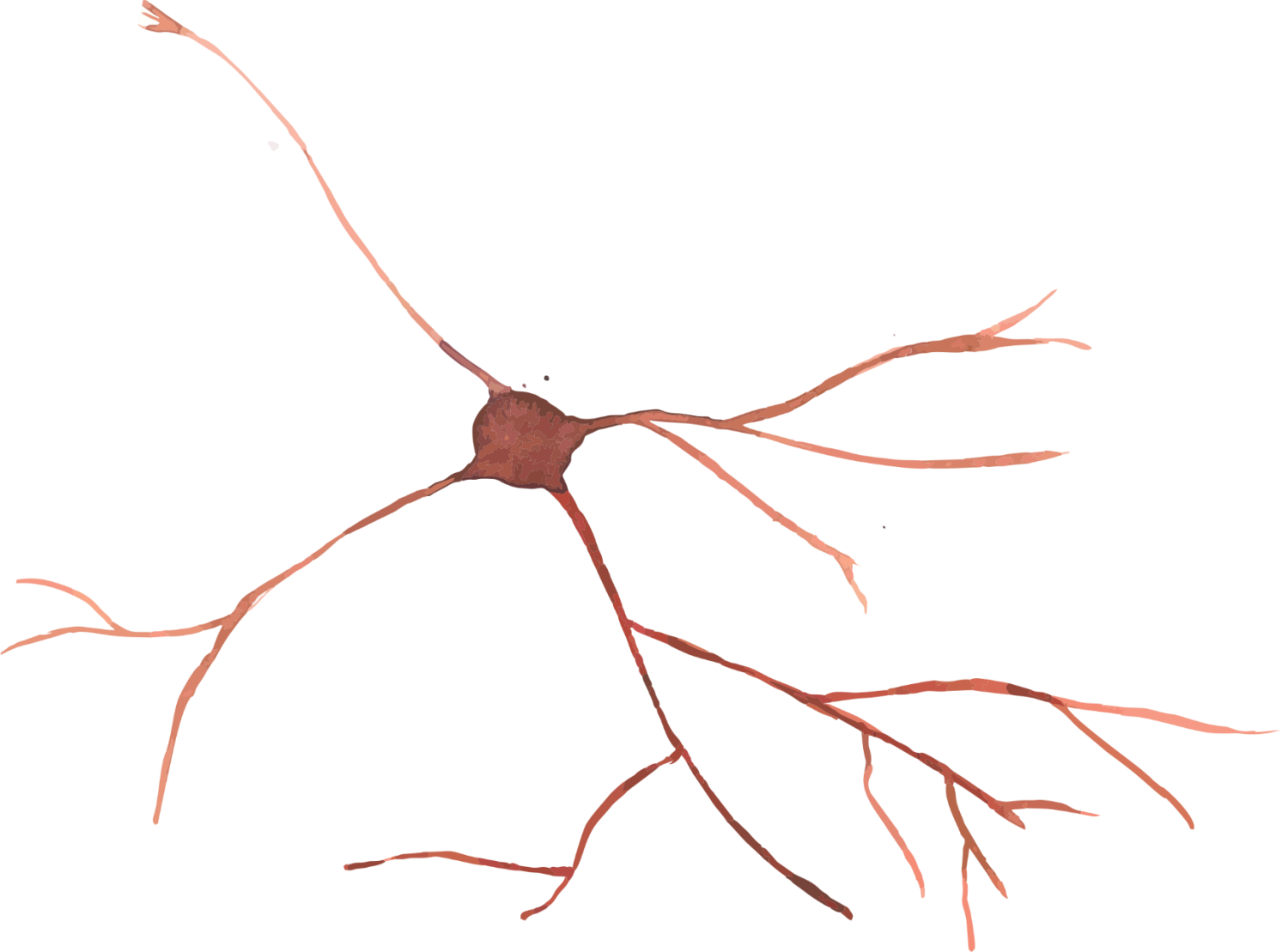
## ABSTRACT

Cell cycle reentry and synaptic failure are two early indicators of Alzheimer's disease (AD). The presence of common molecular mechanisms between both processes suggests a strong connection between cell cycle's control in postmitotic neurons and synaptic activity and plasticity. A potential deregulation in both events could be key for the development of the pathology. To address this question, this work presents an *in vitro* model in which cultured cortical neurons are induced to reenter the cell cycle by expressing SV40 Large T antigen. Cell cycle re-entry was followed by hyperploidy in cortical neurons, which resulted in delayed cell death, as previously observed in AD-affected hyperplod neurons. Neurons that reactivated cell cycle showed diminished spike generation and reduced spontaneous synaptic activity, which correlated with progressive axon initial segment loss and reduced density of dendritic PSD-95 puncta. Membrane depolarization by high extracellular potassium maintained PSD-95 puncta density and partially rescued both spontaneous synaptic activity and cell death. This suggests that AD associated neurons which have reactivated cell cycle can be sustained *in vivo* if integrated in active neuronal circuits whilst promoting synaptic dysfunction. To test the functional effects of this hypothesis, an *in silico* neural network model was developed. The results showed how the presence of hyperplod neurons is able to differentially alter distinct neuronal populations's firing rate and the generated oscillations. Thus, cell cycle reentry in neurons might contribute to cognitive impairment in early stages of AD and neuronal death susceptibility at later stages.

# ÍNDICE

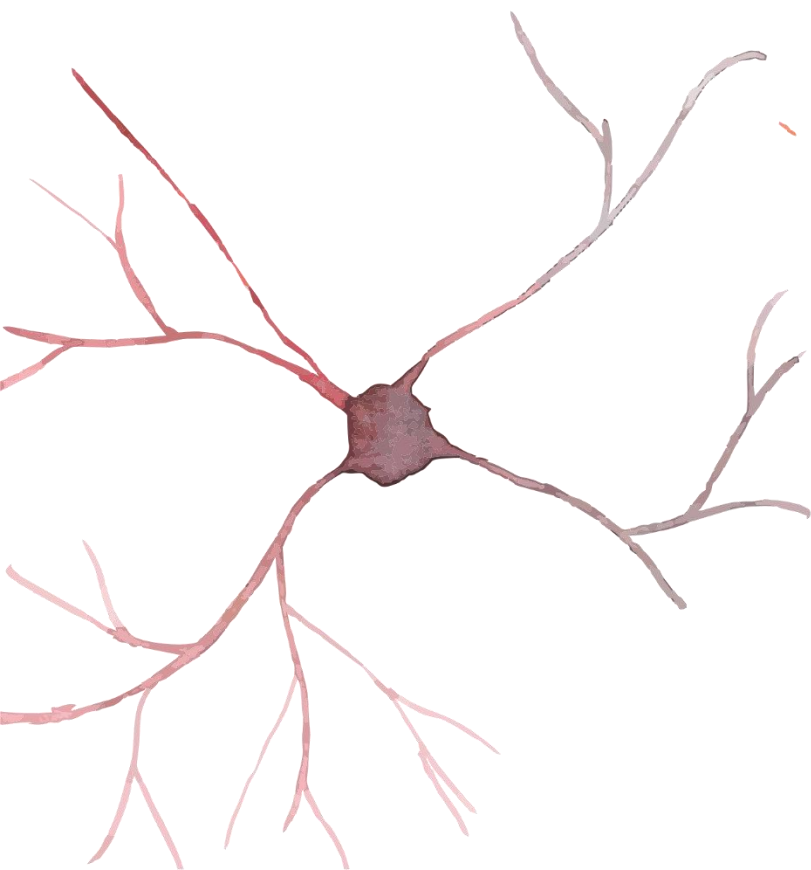
<b>ABREVIATURAS</b>	21
<b>INTRODUCCIÓN</b>	29
Enfermedad de Alzheimer	29
Ciclo celular	30
Ciclo celular en neuronas y tetraploidía somática en el cerebro normal	38
Ciclo celular en neuronas AD	39
Antígeno <i>Large T</i>	40
Propiedades eléctricas de las neuronas	43
AIS	44
PSD-95	45
Disfunción sináptica y AD	46
Conexión entre ciclo celular y la función sináptica en neuronas	47
<b>OBJETIVOS</b>	53
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	59
Plásmidos	59
Anticuerpos	59
Cultivo primario neuronas corticales murinas	59
Lipofección	60
Inmunocitoquímica	61
Citometría estática ( <i>Slice-based Citometry, SBC</i> )	61
TUNEL	62
Análisis estrés oxidativo	62
Registros electrofisiológicos	63
Análisis de imágenes y recuento de neuronas	63
Análisis de PSD-95	64
Análisis del segmento inicial del axón	64
Modelo red neuronal	65
Diseño experimental y análisis estadístico	70
<b>RESULTADOS</b>	75

TA <sub>g</sub> induce síntesis de ADN e hiperploidía en neuronas corticales .....	75
Las neuronas que reactivan el ciclo sufren daño genómico .....	81
Una población de neuronas que han reactivado ciclo se encuentra en fase G <sub>2</sub> avanzada .....	83
La reentrada en ciclo en neuronas induce muerte celular progresiva independiente de cascada apoptótica clásica o estrés oxidativo .....	85
La reentrada en ciclo en neuronas corticales desemboca en disfunción sináptica..	89
La reducción en la capacidad de disparo de las neuronas que reactivan ciclo correlaciona con una deficiencia a nivel de AIS .....	96
La reducción de la actividad espontánea en neuronas que han reactivado el ciclo correlaciona con una reducción de densidad de PSD-95 .....	99
Las neuronas que expresan TA <sub>g</sub> tratadas con altos niveles de potasio extracelular mantienen los niveles de PSD-95, y muestran una recuperación parcial de supervivencia y de actividad sináptica espontánea .....	99
Modelo red neuronal .....	102
<b>DISCUSIÓN</b> .....	111
Las neuronas diferenciadas son capaces de reentrar en ciclo <i>in vitro</i> .....	111
TA <sub>g</sub> como herramienta para la reentrada en ciclo en neuronas <i>in vitro</i> .....	112
La reentrada en ciclo mediante TA <sub>g</sub> presenta distintas poblaciones neuronales..	113
La reentrada en ciclo induce muerte neuronal progresiva .....	118
Relación entre ciclo celular y mecanismos sinápticos en neuronas .....	119
Modelo de red neuronal de reentrada en ciclo y silenciamiento celular .....	121
<b>CONCLUSIONES</b> .....	127
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	133
<b>ANEXOS</b> .....	165
Anexo I: Código modelo neuronal de hiperploidización. ....	166
Anexo II: Resultados complementarios modelo neuronal hiperploidización. ....	172
Anexo III: Tabla estadística.....	174
Anexo IV: Primera fase en el desarrollo de un modelo murino de reactivación de ciclo en neuronas.....	177
Anexo V: Artículo de investigación.....	183





# ABREVIATURAS





## CLAVE DE ABREVIATURAS

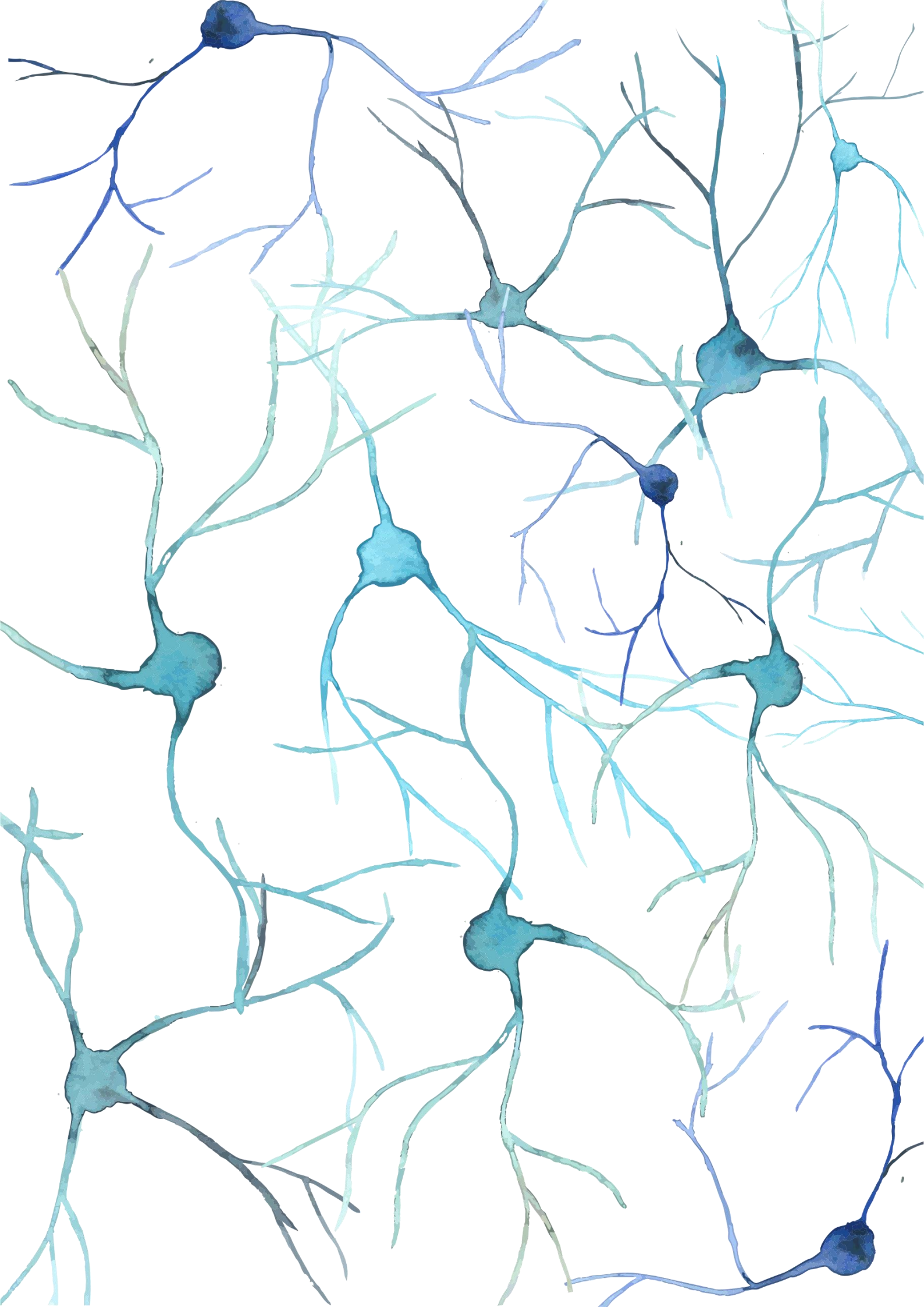
AD	Enfermedad de Alzheimer (del inglés <i>Alzheimer's Disease</i> )
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AIS	Segmento inicial del axón (del inglés <i>axon initial segment</i> )
AMPA	Receptor del ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AnkG	Ankirina G
APC/C	Complejo promotor de anafase (del inglés <i>Anaphase-promoting complex/cyclosome</i> )
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related</i>
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
C	Contenido de ADN (cantidad de ADN en el gameto de dicha especie)
2C	Contenido de ADN diploide
4C	Contenido de ADN tetraploide
Cdc6	del inglés <i>Cell division cycle 6</i>
Cdc20	del inglés <i>Cell division cycle protein 20</i>
Cdc25	del inglés <i>Cell division cycle protein 25</i>
Cdks	Ciclinas dependientes de quinasas (del inglés <i>cyclin-dependent protein kinases</i> )
Cdt1	Factor de replicación del ADN 1
Cdh1	Proteína cadherina 1
CellROX	Sonda fluorogénica para la detección de ROS
Chk1/2	<i>Checkpoint kinase 1, 2</i>
Cm	Capacitancia de membrana

*Current clamp* en castellano fijación de corriente

DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DDR	Respuesta a daño en el ADN (del inglés <i>DNA damage response</i> )
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
dpt	Días post-transfección
DSB	Roturas de ADN de doble hebra (del inglés <i>Double Strand Breaks</i> )
EMI1	del inglés <i>early mitotic inhibitor 1</i>
Fbw7	del inglés <i>F-box/WD repeat-containing protein 7</i>
FBS	Suero fetal bovino
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (del inglés <i>Flourescence in situ hybridization</i> )
G <sub>0</sub>	Quiescencia
G <sub>1</sub>	del inglés <i>first gap</i>
G <sub>2</sub>	del inglés <i>second gap</i>
γ-H2AX	Histona H2AX fosforilada en la Ser139
HS	Suero de caballo
Ge	Conductancia excitatoria
Gi	Conductancia inhibitoria
GFP	Proteína reportera verde fluorescente
HBSS	del inglés <i>Hanks' balanced salt solution</i>
I	Corriente (amperios)
<i>Input</i>	en castellano entrada
K1	Plásmido control con la misma secuencia que el plásmido TAg pero con la mutación E107K
KCl	Cloruro de potasio
K <sub>v</sub>	Canales de potasio dependientes de voltaje

LacZ	Plásmido control que contiene secuencia inocua del gen LacZ
LFP	Potencial de campo local (del inglés <i>Local Field Potential</i> )
M	Mitosis
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2 (del inglés <i>Microtubule-associated protein 2</i> )
MCM2-7	del inglés <i>Minichromosome maintenance complex component 2-7</i>
Myt1	Factor de transcripción mieloide 1 (del inglés <i>Myeloid transcription factor 1</i> )
Na <sub>v</sub>	Canales de sodio dependientes de voltaje
NMDA	Receptor de ácido N-metil-D-aspartico
ORC	Complejo de reconocimiento de origen (del inglés <i>Origin recognition complex</i> )
p53	Proteína supresora de tumores p53
PAs	Potenciales de acción
PBS	Solución salina tampón fosfato (del inglés <i>Phosphate buffer saline</i> )
PBTx	Solución salina tampón fosfato con 0.05 % Triton X-100
PFA	Paraformaldehído
PFV	Pico máximo de fluorescencia (del inglés <i>peak of fluorescence value</i> )
pH3	Histona H3 fosforilada en la Ser10
Plk1/4	del inglés <i>Polo-like kinase 1, 4</i>
PMR	Potencial de membrana en reposo
PP2A	Proteína Fosfatasa 2A (del inglés <i>Protein Phosphatase 2A</i> )
pre-RC	Complejo de pre-replicación
pRb	Retinoblastoma
P/S	Penicilina-estreptomicina
PSD-95	Proteína de densidad post-sináptica 95
PSPs	Potenciales excitatorios e inhibitorios postsinápticos

RFP	Proteína reportera roja fluorescente
ROS	Especies oxidativas reactivas
Rm	Resistencia de membrana
S	Fase de síntesis de ADN
s	Sinapsis
SAC	del inglés <i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
SCF	Complejo ubiquitina ligasa
Skp2	Proteína quinasa 2 asociada a la fase S
ssDNA	Roturas de ADN de hebra sencilla (del inglés <i>Single stranded DNA</i> )
SV40	del inglés <i>Simian Virus 40</i>
$\tau$	Constante de tiempo de membrana
$\tau_e$	Constante excitación
$\tau_i$	Constante inhibición
tAg	Antígeno <i>small t</i>
TAg	Antígeno <i>Large T</i>
TUNEL	del inglés <i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
V	Potencial de membrana
Vt	Potencial de membrana umbral de disparo ( <i>threshold</i> )
<i>Voltage clamp</i>	en castellano fijación de voltaje
Wee1	del inglés <i>Mitosis inhibitor protein kinase</i>
Ws	Peso de la sinapsis



A watercolor illustration of several neurons in shades of blue and teal. The neurons have cell bodies (soma) and branching processes (dendrites and axons) that spread across the page. The style is soft and artistic, with visible brushstrokes and a gentle color gradient.

# INTRODUCCIÓN

## Enfermedad de Alzheimer

La paciente del psiquiatra Alois Alzheimer, Auguste Deter, sufría disfunción cognitiva, deterioro progresivo de la memoria y problemas de comprensión. Su cuadro clínico también incluía pérdida de compostura social, comportamientos que incluían la paranoia así como un declive progresivo del lenguaje. El doctor Alzheimer siguió su caso durante años y al realizar la autopsia del cerebro de Auguste, describió atrofia e hidrocefalia cerebral, entre otros. Asimismo, gracias a su formación histológica, fue el primero en caracterizar la presencia de numerosas placas seniles (depósitos extracelulares del péptido  $\beta$ -amiloide) y otras estructuras densamente enrolladas que se denominaron ovillos neurofibrilares (acumulaciones aberrantes de la proteína estructural tau hiperfosforilada) (Glennner and Wong, 1984). La presencia y cantidad de ambas lesiones neuropatológicas han sido utilizadas como criterio desde entonces para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's Disease*). Tras años de investigaciones, se ha determinado la pérdida neuronal progresiva como el rasgo propio de cualquiera de las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, ningún modelo animal, hasta la fecha, recoge todas las características patológicas que permiten definir la causa de la enfermedad (Hall and Roberson, 2012). Además de la hipótesis acerca del metabolismo del  $\beta$ -amiloide (Simón et al., 2009, Benilova et al., 2012, Selkoe and Hardy, 2016, Canter et al., 2016), se han investigado otras que buscan el enlace entre estas características patológicas y la pérdida neuronal con el estrés oxidativo (Good et al., 1996), la inflamación (Lee et al., 2010) o la hiperfosforilación de proteínas del citoesqueleto (Khatoon et al., 1994, Iqbal et al., 2010, Iqbal et al., 2016), entre otros.

No obstante, además de éstos, dos eventos que se han observado en las primeras etapas de esta patología son la presencia de reguladores de ciclo celular así como degeneración sináptica en neuronas de pacientes de AD (DeKosky and Scheff, 1990, Vincent et al., 1996, Nagy et al., 1997, Masliah et al., 2001, Scheff et al., 2006, Mosch et al., 2007, Arendt, 2009).

Tradicionalmente, las neuronas se han considerado células postmitóticas, es decir, células que permanecen en fase  $G_0$  y no vuelven a reactivar ciclo otra vez (Herrup and Yang, 2007, Frade and Ovejero-Benito, 2015). Esta característica podría considerarse de tipo adaptativo puesto que las neuronas necesitan formar conexiones estables para transmitir la información sináptica de una a otra, y para ello deben abstenerse de reentrar en ciclo celular y dividirse (Arendt, 2009). Sin embargo, cada vez más estudios muestran evidencias

de una reactivación aberrante del ciclo celular, como ocurre en un cáncer, como un potencial desencadenante de esta enfermedad neurodegenerativa.

A continuación se describen los mecanismos básicos de coordinación de ciclo celular en células mitóticas y en neuronas, y las herramientas que disponemos para inducir ciclo en las mismas, en concreto el antígeno *Large T*. Así como, nociones de las propiedades eléctricas neuronales para incidir finalmente en sus papeles potenciales en la etiología de la enfermedad de Alzheimer.

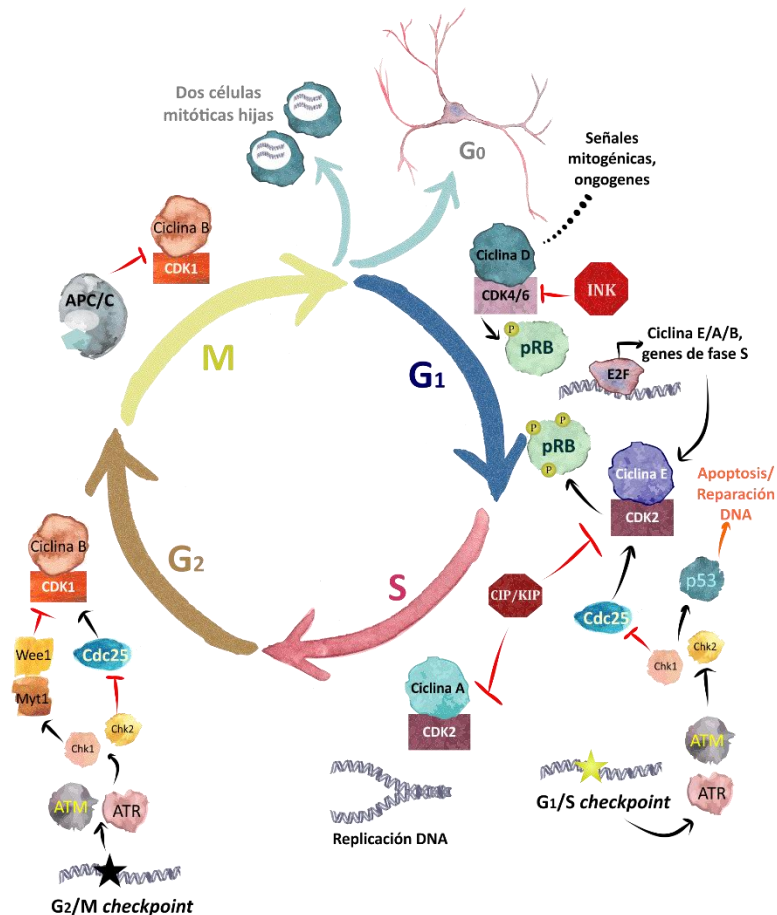
## Ciclo celular

El ciclo celular en eucariotas tiene como objetivo la duplicación del ADN nuclear y obtención de dos células con el mismo contenido de ADN (C) que la célula madre, a través de un proceso de división celular. La maquinaria que controla este proceso está perfectamente coordinada para evitar una segregación cromosómica errónea. En los organismos eucariotas pluricelulares, las células adultas se encuentran en un estado denominado G<sub>0</sub>, en el cual permanecen estables hasta que reciben señales mitóticas, en cuyo caso se ponen en funcionamiento los mecanismos para la reentrada en ciclo.

Las moléculas protagonistas que rigen el ciclo propiamente dicho son una familia de serín-treonín quinasas denominadas ciclinas dependiente de proteínas quinasa (Cdk, *cyclin-dependent protein kinases*) (Malumbres and Barbacid, 2005, DePamphilis et al., 2012). Éstas son las encargadas de fosforilar diferentes sustratos en momentos concretos, coordinando la replicación del material genético y la posterior división o mitosis, que no se debe dar hasta que la primera no esté completada.

El ciclo celular se compone de una serie ordenada de procesos celulares: fase G<sub>1</sub> (*first gap*), fase S (síntesis de ADN), fase G<sub>2</sub> (*second gap*) y fase M (mitosis). Existen dos puntos principales de regulación o *checkpoints* en los cuales se coordinan las actividades de las Cdk para asegurar que cada paso del ciclo se ha completado correctamente y permitir entonces el siguiente. Estos dos puntos se desarrollan entre las fases G<sub>1</sub>/S y las fases G<sub>2</sub>/M. En el caso en el que un error sea detectado en cualquiera de estos pasos, se activaría la maquinaria de parada y reparación del error. En caso de no poder ser subsanado, la maquinaria de muerte se activa para provocar una salida forzosa de ciclo al inducir procesos de muerte programada, como la apoptosis (Malumbres and Barbacid, 2005) (**Fig. 1**).

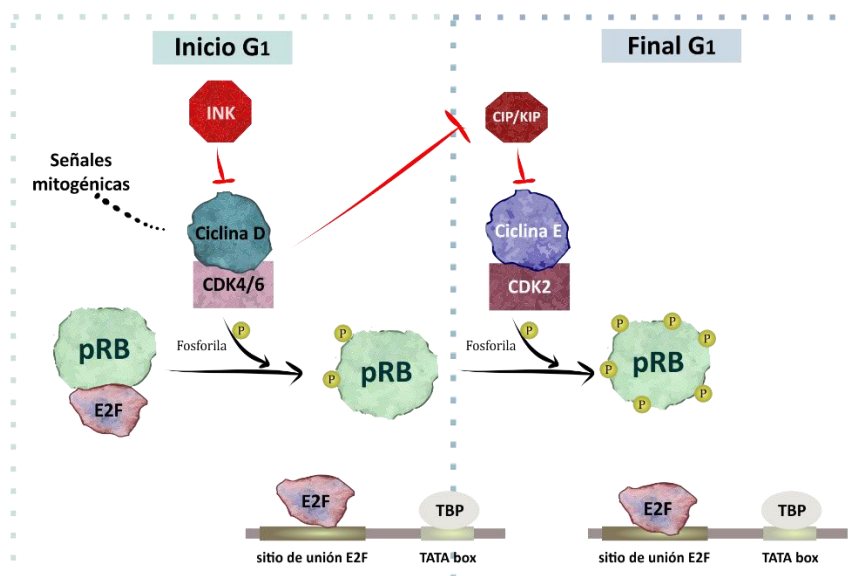




**Figura 1. Esquema del ciclo celular.** El ciclo se divide en 4 fases: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M que constituyen una serie de eventos regulados por las ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) para la replicación fiel del material genético y la repartición en dos células hijas. Existen puntos de control (*checkpoints*) para asegurar la correcta progresión del ciclo. Nótese que una neurona una vez se diferencia, deja de considerarse célula mitótica y permanece en un estado postmitótico (G<sub>0</sub>).

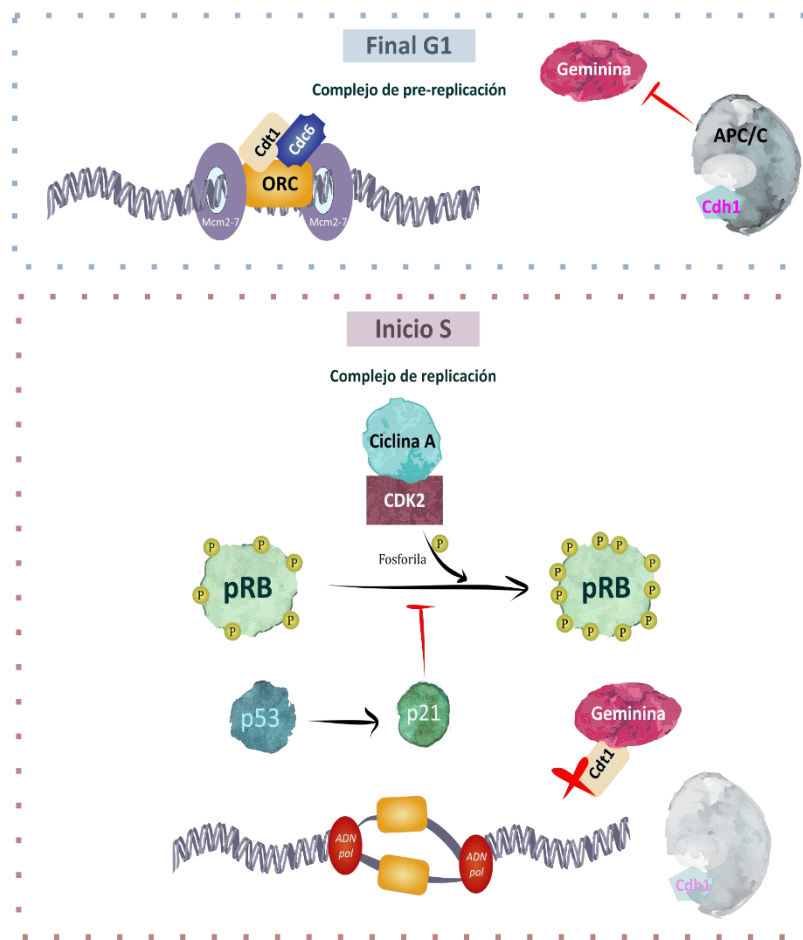
Las señales mitogénicas estimulan la activación de ciclinas de tipo D y su unión con las Cdk4/6. Para que esto ocurra, es necesario, a su vez, superar la inhibición sobre estas últimas por parte de la familia INK4 (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>INK4d</sup>) (Cánepa et al., 2007). Una vez activados los complejos ciclina D-Cdk4/6, éstos fosforilan a los miembros de la familia del retinoblastoma (Rb, p107 y p130), inhibiendo su afinidad por los factores de transcripción E2F, a los cuales tenían secuestrados (Nevins, 2001, Massagué, 2004). Cuando el factor E2F está libre, su unión al ADN induce la transcripción de múltiples genes, como aquellos involucrados en la replicación del ADN y entre ellos, la ciclina E. Ésta se unirá a Cdk2 y se encargará de hiperfosforilar a pRb, creando un *feedback* positivo que promueve la transición completa a fase S (DePamphilis et al., 2012). Asimismo, estos complejos ciclina E-Cdk2 son inhibidos por la familia de proteínas CIP y KIP (p21, p27 y p57) (Besson et al., 2008), las cuales a su vez quedan bloqueadas por acción de las ciclinas D-Cdk4/6 una vez activas (Cánepa et al., 2007). Como última etapa de este bucle de autoregulación, cuando las INK vuelven a recuperar su acción inhibitoria sobre las ciclina D-Cdk4/6, se pierde su

bloqueo sobre las proteínas p27/p21 y finalmente éstas vuelven a ejercer su acción sobre los complejos ciclina E-Cdk2 (Sherr and Roberts, 1999) (Fig. 2).



**Figura 2. Cascadas regulatorias de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular.** Las señales mitogénicas favorecen la activación del complejo ciclina D-Cdk4/6, el cual fosforila a pRb que libera al factor de transcripción E2F. Al final de G<sub>1</sub>, el complejo ciclina E/Cdk2 hiperfosforila a pRb, asegurando su bloqueo y permitiendo que E2F favorezca la transcripción de los genes necesarios para la entrada a fase S.

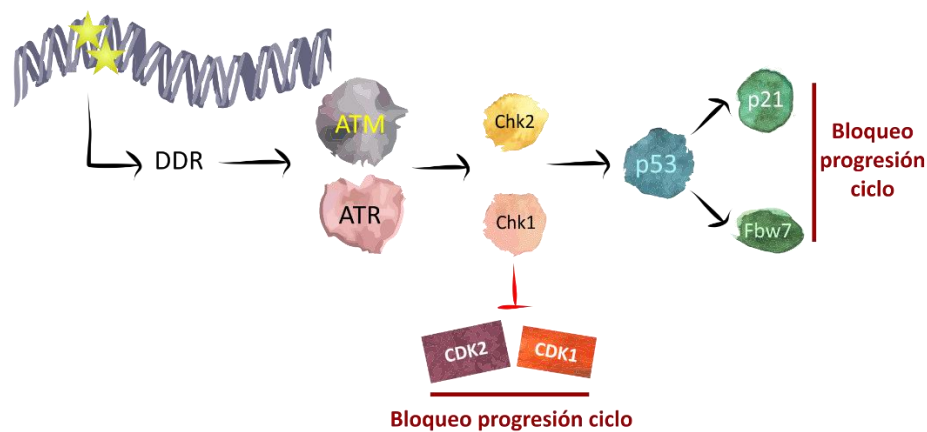
Una vez en fase de replicación, aumentan los niveles de ciclina A, en relevo de los niveles de ciclina E. Esta última también se une a la Cdk2 y juntas, además de apoyar la regulación de la transcripción del programa de E2F en esta transición G<sub>1</sub>/S, fosforilan múltiples sustratos y reclutan los factores necesarios en los orígenes de replicación, así como la unión al ADN de las ADN polimerasas para la iniciación de la síntesis (Harbour et al., 1999). El complejo pre-RC o complejo de pre-replicación, ya reclutado durante G<sub>1</sub>, se une a zonas específicas de los cromosomas y está compuesto por ORC, Cdt1, Cdc6, MCM2-7 (Sivaprasad et al., 2007) (Fig. 3). APC/C<sup>Cdh1</sup> es un complejo clave que controla la formación de estos complejos pre-replicación al modular los niveles de los reguladores de la formación de este complejo: Orc1, Cdc6 y geminina (Peters, 2006). En concreto, para que se ocurra una única replicación del ADN, las Cdks de la fase S y la proteína geminina deben mantener bajos sus niveles excepto en la fase final de G<sub>1</sub> y S donde estos niveles aumentan provocando la activación de estos orígenes de replicación y el comienzo de la síntesis de ADN. La geminina es la molécula encargada de bloquear el inicio de la replicación en momentos inapropiados al inhibir el factor de replicación Cdt1, previniendo así el ensamblaje del complejo pre-replicative en los orígenes (Penas et al., 2012).



**Figura 3. Formación del complejo de pre-replicación al final de la fase G1 e inicio de la replicación en fase S.**

La formación del complejo de pre-replicación se da a final de G1, gracias a la inhibición de la proteína geminina por parte de APC/C. Una vez en fase S, la ciclina A/Cdk2 hiperfosforila a pRb, favoreciendo su bloqueo. La replicación del ADN ocurre tras el secuestro de Cdt1 por parte de geminina y la unión de las ADN polimerasas.

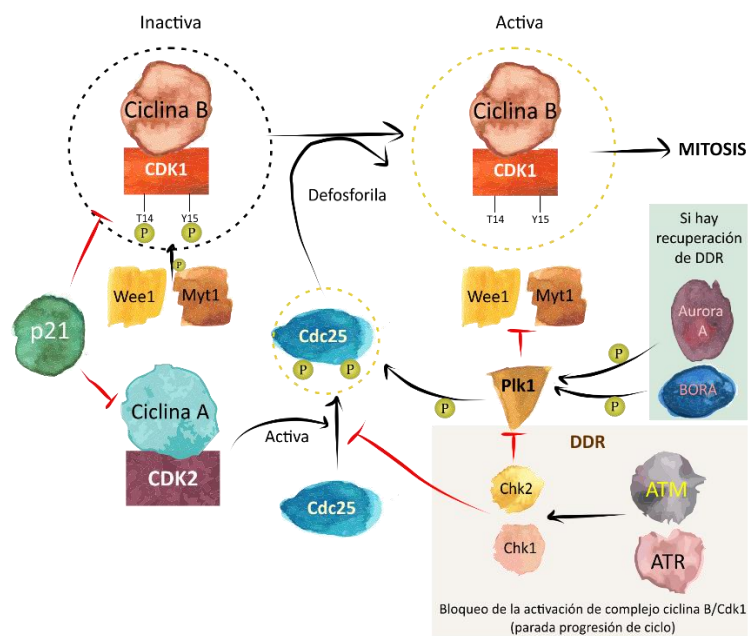
Existe un mecanismo de control o *checkpoint* secundario en este punto que tiene como objetivo el bloqueo de la iniciación de la replicación del ADN cuando se producen alteraciones en la entrada en fase S o estrés replicativo. Este mecanismo de control consiste en la activación de una respuesta denominada respuesta ante daño genómico (DDR, *DNA damage response*). Este *checkpoint* supone la activación de reguladores como son ATM y ATR, siendo el primero activado ante roturas de doble cadena del ADN (DBS, *double strand breaks*) y el segundo ante roturas de una cadena simple (ssADN, *single strand breaks*) (Abraham, 2001, Blackford and Jackson, 2017, Saldivar et al., 2017). La activación de estos efectores favorece la activación de Chk1/Chk2 los cuales a su vez desempeñan otras importantes funciones. En concreto la de estabilización de p53, proteína que controla la parada o salida del ciclo, permitiendo la expresión y actuación de otros reguladores como p21 o Fbw7, desencadenando un bloqueo en la progresión del ciclo (Minella et al., 2007). También existen mecanismos de parada de la replicación del ADN independientes de la cascada p53/p21 que consisten en la inhibición de Cdc25 por Chk1, induciendo a su vez inhibición directa sobre Cdk2/1 (Saldivar et al., 2017) (Fig. 4).



**Figura 4. La detección de daño en el ADN desencadena las cascadas de DDR (*DNA Damage Response*).** Ante la presencia de roturas en el ADN se activa la cascada de reparación de daño de ADN que consiste en la activación de ATM/ATR, que a su vez activan Chk1/Chk2. Estos efectores promueven un bloqueo en la progresión del ciclo que puede ser dependiente o independiente de p53.

Una vez completada la fase de replicación, la célula entra a la fase G<sub>2</sub> de ciclo, en la cual se coordinan mecanismos para la duplicación de los orgánulos celulares y la preparación de la célula para la división. En la etapa inicial de esta fase está ciclina A junto con Cdk1, los cuales regulan la fosforilación de sustratos específicos para la transición de esta fase. En la etapa final es el complejo ciclina B-Cdk1 el encargado de permitir la entrada en mitosis (Malumbres and Barbacid, 2005). Los niveles y la actividad de ciclina B comienzan a aumentar al final de la fase S alcanzando su pico de máxima expresión y actividad en fase M. El principio de la mitosis coincide cuando la forma activa de ciclina B se trasloca al núcleo (Jackman et al., 2003). Este complejo ciclina B-Cdk1 permanece inactivo al ser fosforilado por las quinasas Wee1 y Myt1 hasta que la fosfatasa Cdc25, activada a su vez por ciclina A-Cdk2, compite por el sitio de unión de ATP y defosforila dos residuos vecinos (treonina 14 y tirosina 15) claves para la activación del complejo (Bartek et al., 2004). Por otro lado, la quinasa Plk1 desempeña un papel doble en este momento del ciclo. Esta quinasa ayuda a la fosforilación de Cdc25 así como a inhibir el bloqueo del complejo ciclina B-Cdk1 por la familia de quinasas Wee1 permitiendo definitivamente la entrada en fase M (Baus et al., 2003). Estos complejos promueven la activación de este complejo ciclina B-Cdk1 que se encarga de fosforilar numerosos sustratos necesarios para la división de la célula, como proteínas de unión a microtúbulos o lamininas nucleares, siendo eventos necesarios para la ruptura de la envuelta nuclear, la separación de centrosomas, la condensación de los cromosomas o la fragmentación del aparato de Golgi (Nigg, 2001). Con todo esto, queda patente que una perfecta coordinación espaciotemporal de los patrones de actividad de ciclina B-Cdk1 es necesaria para asegurar la regulación del ciclo en este punto (Lombardi and Lasagni, 2016). Por otro lado, estas enzimas están, a su vez, reguladas por

los mecanismos similares a los del *checkpoint* de G<sub>1</sub>/S, de manera que ante un fallo en la fase de replicación del ADN, se fuerza la parada del progreso del ciclo. Estímulos de daño o estrés activan rutas dependientes o independientes de p53 para inhibir la actividad de Cdk1 y provocar una parada en G<sub>2</sub> (Taylor and Stark, 2001, Abraham, 2001). Una de estas rutas implica la activación de las proteínas quinasas Chk1 y Chk2 por ATM/ATR, en las cuales se inactiva la fosfatasa Cdc25 y se activa Wee1, bloqueando la activación del complejo ciclina B-Cdk1 y, por la tanto, la entrada en fase M (Blackford and Jackson, 2017). Cuando la célula se recupera del daño en el ADN, la proteína Plk1 es fosforilada por AURORA A y BORA (Seki et al., 2008, Macurek et al., 2009). Una vez activada es capaz de fosforilar a su vez al inhibidor de la Cdk1, Wee1, y marcarlo para su degradación, a la vez que promueve la activación de Cdc25, facilitando la entrada a la siguiente fase (Kousholt et al., 2012) (Fig. 5).

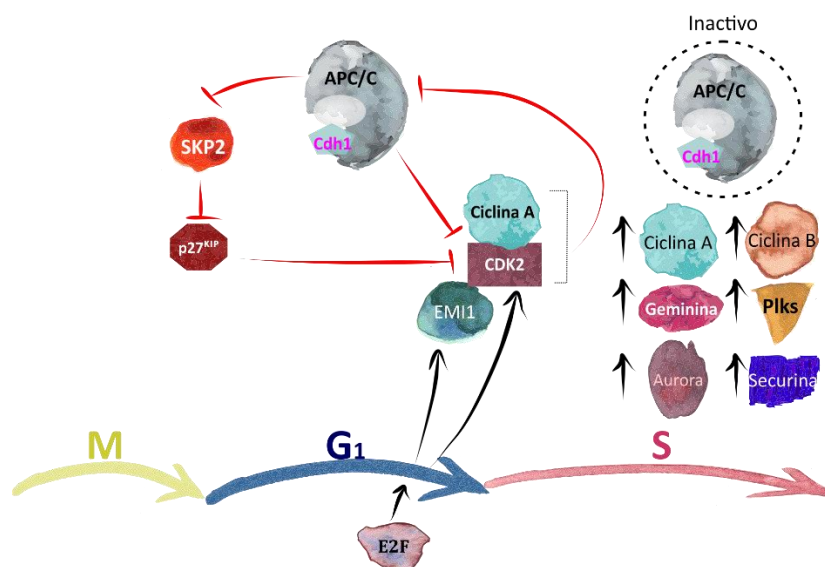


**Figura 5. Control del paso G<sub>2</sub>/M.** Para la transición a mitosis es necesaria la activación del complejo ciclina B/Cdk1 que se encuentra inhibido por fosforilación dos residuos (T14 y Y15) por parte de Wee1/Myt1. Para superar este bloqueo es necesaria su desfosforilación por la fosfatasa Cdc25 que a su vez es activada por el complejo ciclina A/Cdk2. Si se detecta DDR se bloquea la desfosforilación a través de la inhibición de Plk1. Si se supera la DDR, el mecanismo se reactiva a través de Aurora A y BORA que activan a Plk1, y ésta a Cdc25.

La última fase del ciclo es la mitosis que conlleva los procesos de división nuclear (cariocinesis) y la división citoplasmática (citocinesis). Esta fase a su vez se subdivide en: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Durante la primera parte de este proceso, la cromatina de ADN se condensa en cromosomas y los centrosomas previamente duplicados migran a extremos opuestos. A continuación, la envuelta nuclear se fragmenta y los centrosomas comienzan a nuclear los microtúbulos que, posteriormente en prometafase, serán capturados por los cinetocoros (estructuras especializadas que se asocian con los centrómeros en los cromosomas mitóticos). Una vez ancladas las cromatinas hermanas, en metafase, éstas se posicionan ordenadas en el plano ecuatorial de la célula con los correspondientes microtúbulos dirigidos hacia los polos opuestos. Ya en anafase se produce una pérdida en la cohesión entre las cromátidas hermanas, siendo cada una de ellas arrastrada hacia los polos donde se encuentran cada centrosoma. Cuando éstos llegan a los

polos, la envuelta nuclear se vuelve a reconstituir englobando cada conjunto de cromosomas y es entonces cuando las cromátidas comienzan a descondensarse en telofase. Por último, se forma un anillo contráctil de actina y miosina que provoca la división citoplasmática completa y da lugar a dos células hijas dotadas con el mismo material genético (Nigg, 2001).

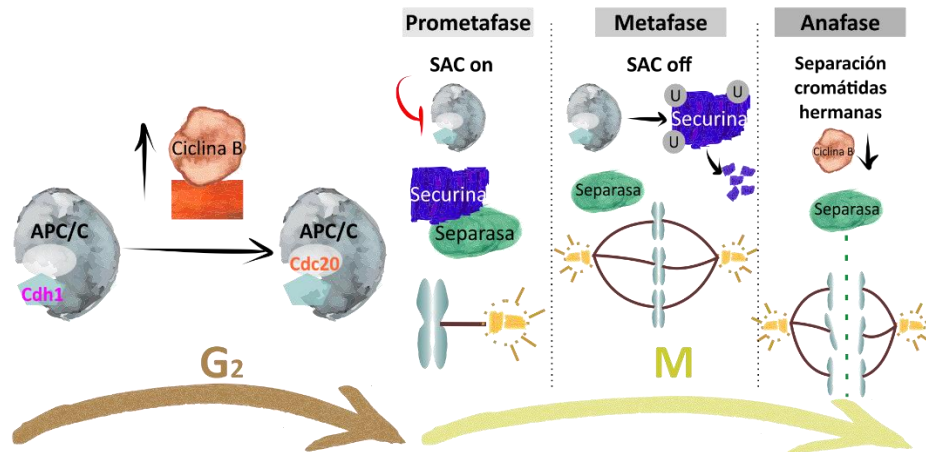
El coordinador fundamental para la sucesión de todas estas etapas es el complejo promotor de anafase, APC/C (*anaphase-promoting complex*) (Amon et al., 1994, Peters, 2006). Se trata de una ubiquitin ligasa E3 encargada de determinar los estados de alta o baja actividad de las Cdk's al reconocer y marcar mediante ubiquitinación las distintas ciclinas a lo largo del ciclo para su destrucción por el proteosoma 26S. La regulación de la actividad de APC/C en mitosis es imprescindible para asegurar que la célula no separe las cromátidas hermanas ni se salga de la fase M hasta que todos los cromosomas se encuentran bien anclados a la maquinaria mitótica y así realizar una segregación igualitaria de pares de cromosomas en ambas células hijas (Peters, 2006, Sullivan and Morgan, 2007). Para conseguir que este proceso se cumpla, APC/C a su vez es controlado por las proteínas SAC (del inglés *spindle assembly checkpoint*), las cuales determinan si los cromosomas están correctamente unidos a través de sus cinetocoros a los microtúbulos de la maquinaria mitótica (Kops et al., 2005, Peters, 2006, Sullivan and Morgan, 2007).



**Figura 6. Bucle de regulación entre APC/C<sup>Cdh1</sup>, ciclina A y p27<sup>KIP</sup> en fase G<sub>1</sub>.** Durante G<sub>1</sub>, APC/C se encuentra unido a su co-activador Cdh1. Juntos inhiben tanto a ciclina A como a SKP2, lo cual favorece a su vez una doble represión de ciclina A por p27. Al final de la fase G<sub>1</sub>, la transcripción de los factores E2F estimula la transcripción de EMI1, que inhibe a APC/C<sup>Cdh1</sup>, provocando el aumento de los niveles de SKP2 y la disminución de p27. En conjunto, esta cascada en este punto favorece el aumento de ciclina A y la entrada a fase S. La inactivación de APC/C<sup>Cdh1</sup> desde G<sub>1</sub> a M permite la acumulación de securina, geminina, Plks, Aurora y ciclina B. Figura modificada de Pines, 2011 (Pines, 2011).



El APC/C se encuentra inactivo desde el final de la fase G<sub>1</sub> hasta el principio de mitosis. En G<sub>1</sub>, estando unido a su co-activador Cdh1, provoca la represión de la ciclina A y la proteína 2 quinasa asociada a la fase S (SKP2, *S phase kinase-associated protein 2*) (Peters, 2006, Sullivan and Morgan, 2007). La represión de esta última estabiliza a p27<sup>KIP1</sup>, la cual a su vez inhibe cualquier complejo formado por ciclina A/E con sus Cdks. Al final de la fase G<sub>1</sub>, cuando el factor de transcripción E2F es liberado, se estimula la transcripción de el inhibidor temprano mitótico 1 (EMI1, *early mitotic inhibitor 1*), el cual inhibe progresivamente a APC/C<sup>Cdh1</sup>, permitiendo que los niveles de SKP2 aumenten y los de p27<sup>KIP1</sup> disminuyan en consecuencia, y con ello favoreciendo la transcripción de ciclina A (Hsu et al., 2002, Pines, 2011). A medida que los niveles del complejo con ciclina A aumenta el co-activador Cdh1 se fosforila reprimiendo así la actividad de APC/C<sup>Cdh1</sup>. Este estado inactivo permite que los sustratos de este complejo se acumulen, como la securina (Nasmyth, 2002) (encargada de inhibir la separasa, la cual es la enzima que corta los complejos de cohesina que mantienen las cromátidas hermanas unidas), la geminina (McGarry and Kirschner, 1998) (proteína que inhibe a la proteína de replicación del ADN Cdt1), y otras como la familia de quinasas Plks (del inglés *Polo-like kinases*) y AURORA (Littlepage and Ruderman, 2002, Lindon and Pines, 2004) y las ciclinas A y B (**Fig. 6**). Las ciclinas B, en concreto, a medida que aumentan sus niveles favorecen la unión de APC/C a su otro co-activadores, el Cdc20 (Rudner and Murray, 2000, Kraft et al., 2003). El complejo APC/C<sup>CDC20</sup> es el encargado de degradar tanto la securina como la ciclina B en metafase. Cuando el primero es degradado se libera la separasa, permitiendo la separación de las cromátidas hermanas. Cuando se degrada la ciclina B se inactiva la Cdk1 permitiendo la salida de mitosis. Sin embargo, estos eventos sólo deben ocurrir cuando todos los cromosomas se encuentran alineados y anclados a los microtúbulos mitóticos para la separación de cromátidas en metafase. Por ello, el SAC (del inglés *spindle assembly checkpoint*) controla la inactivación de este complejo APC/C<sup>CDC20</sup> hasta el momento necesario mediante el reclutamiento de proteínas como Mad que secuestran a Cdc20 en los centrómeros (Musacchio and Salmon, 2007, Xu et al., 2009). Una vez que las cromátidas hermanas se han separado, vuelve a producirse un cambio en la especificidad del co-activador de APC/C, cuando Cdh1 es de nuevo defosforilado, a consecuencia de una bajada en los niveles de actividad de ciclina B-Cdk característico de anafase (Hagting et al., 2002). Por último, en las últimas fases de mitosis se da la degradación de proteínas mitóticas como las quinasas AURORA, las Plks o Cdc20, lo cual asegura un ambiente con actividad quinasa disminuida que permite la citocinesis (Floyd et al., 2008, Zhou et al., 2016) y, finalmente, la salida de la fase M de las dos células hijas (**Fig. 7**).



**Figura 7.** En fase M el APC/C<sup>Cdc20</sup> se mantiene inactivo por el SAC (*spindle assembly checkpoint*). Cuando los cromosomas se encuentran alineados y anclados correctamente al huso mitótico, el SAC se inactiva y APC/C<sup>Cdc20</sup> ubiquitina y favorece la degradación de la securina que libera a la separasa, permitiéndose la separación de las cromátidas hermanas. El APC/C se une a sus co-activadores en función de los niveles de ciclina B.

### Ciclo celular en neuronas y tetraploidía somática en el cerebro normal

Las neuronas maduras de los vertebrados han sido clásicamente descritas como neuronas postmitóticas con contenido diploide de su material genético (Swift, 1953). Sin embargo, este concepto fue cambiando a partir de una serie de estudios pioneros que mostraron la presencia de neuronas tetraploides (con 4 veces la cantidad de ADN genómico o 4C) en vertebrados, como por ejemplo las células de Purkinje en cerebelo (Lapham, 1968, Herman and Lapham, 1968, Museridze et al., 1975). Si bien otros trabajos no contemplaban la posibilidad del carácter hiperploide en neuronas diferenciadas (Swartz and Bhatnagar, 1981), el desarrollo de técnicas más precisas, como la citometría de flujo o el FISH, ha permitido la cuantificación de la cantidad de ADN facilitando la demostración de la presencia de neuronas hiperploides en múltiples zonas del sistema nervioso central en vertebrados (Morillo et al., 2010, López-Sánchez et al., 2011, López-Sánchez and Frade, 2013, Fard et al., 2013, López-Sánchez et al., 2017b, Sigl-Glöckner and Brecht, 2017). Este tipo de neuronas también se han detectado en la corteza cerebral de ratón, en donde la mayoría constituyen una subpoblación de neuronas de proyección de gran tamaño (López-Sánchez and Frade, 2013), así como en distintas regiones del sistema nervioso del pollo (como la espina dorsal, cerebelo, ganglios espinales o los lóbulos ópticos) (López-Sánchez et al., 2011). Además, alrededor de un 10 % de neuronas corticales humanas poseen un contenido de ADN mayor de 2C o diploide, de las cuales un 2 % son tetraploides (Mosch et al., 2007, López-Sánchez et al., 2017a). Los mecanismos específicos de generación de neuronas tetraploides somáticas están todavía por dilucidar y podría depender del fenotipo neuronal (Frade and Ovejero-Benito, 2015), si bien sabemos que el factor p75 está



involucrado (Morillo et al., 2010, López-Sánchez and Frade, 2013) y E2F4 participa en la reactivación del ciclo (Morillo et al., 2012). También se sabe que la generación de tetraploidía somática neuronal es un fenómeno regulado que tiene su origen durante el desarrollo, en el momento de la migración y diferenciación de los progenitores neurales hacia sus posiciones finales. Estas neuronas tetraploides somáticas se constituyen como neuronas funcionales cuando se diferencian totalmente (López-Sánchez and Frade, 2013), encontrándose perfectamente integradas en el circuito o sistema, como ocurre con otras células poliploides somáticas de otras poblaciones como los megacariocitos (Vitrant et al., 1998), los cardiomiocitos (Zanet et al., 2010) o los hepatocitos (Duncan, 2013).

### **Ciclo celular en neuronas y AD**

Una vez que las neuronas maduran y se diferencian en el sistema nervioso, deben mantener su estado postmitótico bajo estricto control, ya que una reentrada en ciclo celular al alcanzar el estado diferenciado tiene como destino normalmente la muerte neuronal. De hecho, se ha asociado la reactivación de ciclo celular en neuronas maduras con rasgos neuropatológicos, como la acumulación de placas de  $\beta$ -amiloide y tau (Hernández-Ortega et al., 2007, Majd et al., 2008, Silva et al., 2014).

En este contexto, se ha correlacionado la hiperploidía neuronal *de novo* con la progresión de la enfermedad de Alzheimer. En línea con esto, se ha demostrado un aumento en el contenido de ADN de neuronas en la corteza entorrinal de pacientes de AD, siendo ésta la zona afectada por la degeneración de los ovillos neurofibrilares y la pérdida neuronal ya en las primeras etapas (Hyman et al., 1986, Braak and Braak, 1991, Mosch et al., 2007). Asimismo, se ha observado un incremento significativo de neuronas hiperploides en este mismo área en etapas pre-clínicas de AD, siendo esta población la más vulnerable a morir en comparación con las neuronas diploides (Arendt et al., 2010).

Uno de los primeros trabajos a partir del cual se empezó a considerar la posibilidad de una reactivación aberrante de la maquinaria de ciclo como causa de la enfermedad de Alzheimer es el realizado por Vincent y colaboradores en 1996 (Vincent et al., 1996). Este estudio demostró la presencia de formas activas de la quinasa Cdk1 (cdc2), junto con su ciclina activadora, ciclina B, en neuronas afectadas con ovillos neurofibrilares en cerebros de pacientes de AD. Además, otros estudios han sido detectados cambios en la expresión de proteínas de ciclo celular en neuronas de individuos con AD como es el caso de ciclina D (Yang et al., 2003) y B (Nagy et al., 1997, Mosch et al., 2007), Cdk4 (McShea et al., 1997), Cdk1 (Lu et al., 1999), p27 (Ogawa et al., 2003), E2F1 (Jordan-Sciutto et al., 2002) y pRb (Thakur et al., 2008). Otra de las proteínas que presenta un redistribución subcelular

ectópica en neuronas ha sido Cdk5. Esta Cdk aunque sí tiene funciones importantes en maquinaria sináptica (Cruz and Tsai, 2004b, Morabito et al., 2004, Seeburg et al., 2008, Odajima et al., 2011, Kawauchi, 2014) no se la relaciona clásicamente con el ciclo celular. Sin embargo, varias investigaciones apuntan a un papel clave de esta Cdk5 junto con la ciclina E en el desencadenamiento de una reactivación de ciclo en estas neuronas cuando se produce una entrada del flujo de calcio extracelular como consecuencia de un daño excitotóxico (Su and Tsai, 2011, Chang et al., 2012).

En conclusión, el ciclo celular está implicado en las primeras etapas en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. Por ello, en los últimos años se ha planteado la hipótesis acerca de si la acumulación de oligómeros de  $\beta$ -amiloide es en realidad consecuencia de la entrada aberrante al ciclo celular (Kirouac et al., 2017). Se ha observado que quinasas como GSK3, JNK, ERK, Cdk5, Cdk4 y Cdk1 son capaces de fosforilar el sitio treonina 668 (Thr668) del dominio citoplasmático del APP (proteína precursora amiloide, del inglés *Amyloid Precursor Protein*) (Suzuki et al., 1994, Aplin et al., 1996, Iijima et al., 2000, Standen et al., 2001, Muresan and Muresan, 2005, Judge et al., 2011). Esta fosforilación aumenta la actividad proteolítica de la enzima  $\beta$ -secretasa (responsable de la primera escisión del APP que generan los fragmentos tóxicos amilogénicos) (Lee et al., 2003, Chang et al., 2006). Otra relación similar se ha propuesto con la hiperfosforilación de tau por quinasas de ciclo, como Cdk1 u otros oncogenes (Vincent et al., 1996, McShea et al., 2007, Mendoza et al., 2013).

### **Antígeno Large T**

El antígeno Large T (TAg) es una proteína codificada por el virus SV40 perteneciente a la familia *Polyomaviridae*, los cuales son virus de doble cadena de ADN. Los antígenos T son proteínas de expresión temprana durante el ciclo de infección viral que fuerzan la expresión génica en el hospedador para llevar a cabo la replicación del ADN viral (An et al., 2012). Este antígeno se emplea normalmente como oncogén para la inmortalización y transformación de numerosos tipos celulares así como la inducción de neoplasia cuando se expresa en roedores (An et al., 2012). Además del TAg, todos los poliomavirus codifican otra proteína temprana tras un proceso de *splicing*, el antígeno *small t* (tAg), cuya principal función es actuar contra la proteína fosfatasa PP2A, con múltiples funciones dentro del ciclo (Kolupaeva and Janssens, 2013, Wlodarchak and Xing, 2016). Sin embargo, este antígeno no es necesario para la infección *in vitro*.

El antígeno TAg está compuesto por 4 dominios: dominio J, dominio de unión al origen (OBD, del inglés *origin binding domain*), dominio de unión a zinc (Zn) y dominio de

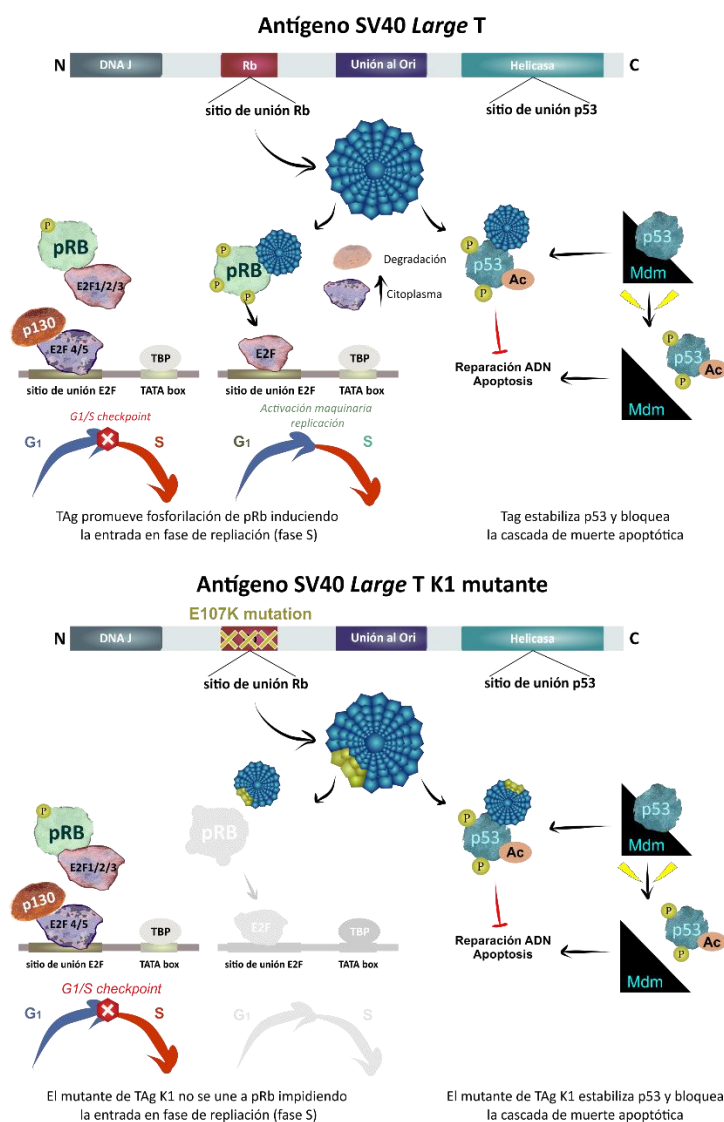
ATPasa AAA<sup>+</sup>. Dentro de estos dominios, el denominado J contiene una secuencia motivo LXCXE, crítica para la interacción entre el TAg y las proteínas del retinoblastoma.

TAg actúa sobre los tres miembros de esta familia del retinoblastoma: pRb, p107 y p130. Las células diferenciadas no son capaces de volver a entrar en ciclo celular gracias al bloqueo por parte de esta familia de proteínas hacia la familia de los factores de transcripción E2F. Esta familia de factores se subdivide en dos tipos: los factores activadores E2F1, E2F2 y E2F3, y los factores represores, en lo que se incluyen E2F4 y E2F5. En primer lugar, cuando TAg está presente primero se une a Rb a través del motivo LXCXE, evento que produce la liberación de los factores de transcripción E2F1-3. En segundo lugar, el TAg promueve la disolución del complejo p130/E2F4-5 que estaba unido a los promotores de los E2F activadores, bloqueando, de esta forma, activamente la transcripción. Una vez p130 es fosforilado, el sitio queda libre para los E2F1-3 dando paso a la transcripción de genes necesaria para el paso de G<sub>1</sub> a S (como genes para la síntesis de nucleótidos, de replicación y reparación de ADN, etc) (An et al., 2012).

La otra diana clave de TAg es la proteína supresora de tumores, p53. Esta proteína mantiene sus niveles bajos en condiciones normales debido a su degradación por parte de la ubiquitín ligase E3 Mdm2 (Beckerman and Prives, 2010). Sin embargo, ante estímulos de estrés celular, p53 se estabiliza al ser fosforilado y acetilado, convirtiéndose en un potente regulador transcripcional de genes de reparación de daño del ADN, parada de ciclo, senescencia o apoptosis (Brady et al., 2011). En definitiva, bloqueando la progresión del ciclo celular. TAg se une a esta proteína a través de su dominio de unión al ADN, estabilizándola pero bloqueando de manera efectiva toda superficie de unión al ADN y, por lo tanto, inhibiendo mecanismos de transactivación de promotores dependientes de p53 y la formación de la forma tetramérica activa (Lilyestrom et al., 2006). Otra diana de interés de TAg es Fbw7, que es el componente de reconocimiento del sustrato de SCF/Fbw7, la ubiquitín ligasa que degrada proteínas como la ciclina E, c-Myc, c-Jun, Notch o presenilina 1. De modo que la presencia de TAg promovería un aumento en la actividad de ciclina E al favorecer tanto su ruta de síntesis como la de la inhibición de su destrucción (Welcker and Clurman, 2005). No obstante, ni p63 ni p73, proteínas de la misma familia de p53 con funciones complementarias, son diana para TAg (Kojima et al., 2001). Debido a esta estabilización y no degradación de p53, está aún por determinar si el complejo TAg-p53 pudiese presentar una ganancia de función (Hermannstädter et al., 2009).

El antígeno TAg del SV40 es, en conclusión, una herramienta que fuerza la entrada al ciclo celular, al permitir el paso de fase G<sub>1</sub> a S, a través del bloqueo de la familia de proteínas del retinoblastoma, y al evitar una muerte prematura de la célula al estabilizar a

p53 y bloquear una de las rutas de muerte apoptótica. Su uso constituye, por tanto, una estrategia para el estudio de los efectos de la reactivación de ciclo celular en neuronas diferenciadas y su asociación como mecanismo de neurodegeneración. En el presente trabajo, además de TAg, se hace uso de una variante de este antígeno pero mutada en E107K. Esta mutación impide la unión de la proteína TAg a la familia de las proteínas del retinoblastoma, impidiendo la progresión a la fase de replicación (**Fig. 8**).



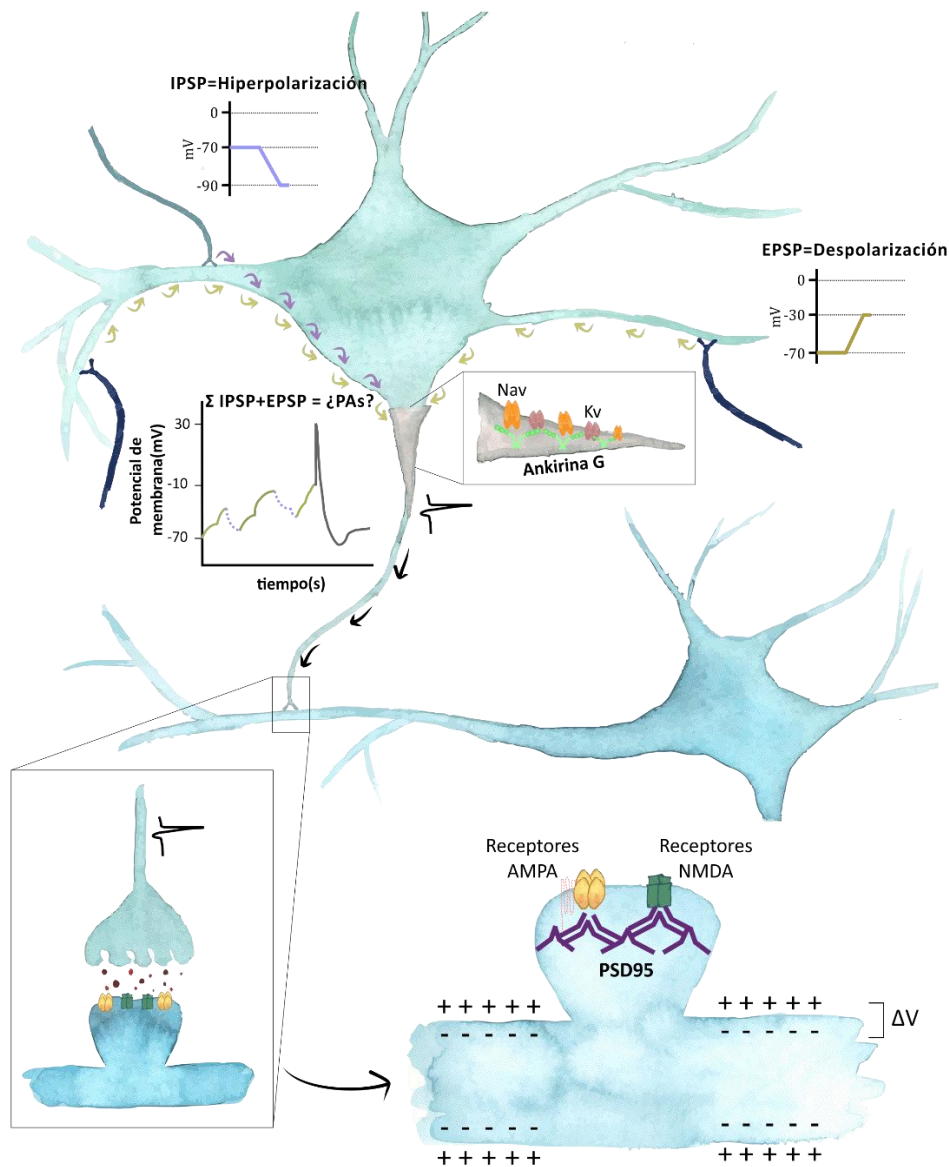
**Figura 8. Mecanismo de acción del antígeno Large T del SV40 (TAg) respecto al mecanismo del mutante de Large T K1 (con mutación E107K en el dominio de unión LxCxE al retinoblastoma (pRb), la cual impide entrada en fase de replicación).**

Las primeras investigaciones que emplearon TAg para forzar la entrada en ciclo en neuronas describían cómo su expresión en células fotorreceptoras en la retina y células de Purkinje provocaba síntesis de ADN pero, en vez de desencadenar proliferación y generación de tumores, inducía muerte celular (al-Ubaidi et al., 1992, Feddersen et al., 1992).

Asimismo, se ha observado la existencia de una acumulación de p53 mutado tanto en modelos murinos de AD (Serrano et al., 2010) como en pacientes (Uberti et al., 2008). Estas formas mutadas, ya sea por mutaciones somáticas o por modificaciones postraduccionales provocan cambios conformacionales que evitan la formación de los tetrameros necesarios para la función fisiológica normal de p53.

## Propiedades eléctricas de las neuronas

Las neuronas son células que se caracterizan por ser excitables -capaces de generar potenciales de acción (PAs)- y presentar relaciones sinápticas con células vecinas. En conjunto son células capaces de influirse eléctrica y químicamente entre ellas, y en última instancia, construir complejos circuitos que representan y transfieren información. Como cualquier célula, las neuronas están delimitadas por una membrana lipídica impermeable que separa el medio intra y extracelular, de distinta concentración iónica, que en consecuencia genera una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana. La diferencia total de carga entre el interior y el exterior de la célula se denomina potencial de membrana en reposo (PMR). En general, éste ronda los -70 mV, si bien varía en los distintos tipos neuronales. Para que una neurona dada envíe una señal a otra/s es necesario que el *input* que ella misma recibe sea lo suficientemente potente para generar un potencial de acción. En este proceso, las distintas señales que recibe de otras neuronas a sus dendritas se integran en forma de cargas de voltaje que modifican el potencial de membrana, el cual si aumenta hasta un valor umbral (despolarización de la membrana, alrededor de -50 mV) provocaría la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$ ), generándose un potencial de acción. Este potencial de acción viaja a través del axón hasta los terminales axónicos donde propicia la liberación de neurotransmisores. Esta liberación es impulsada por la despolarización de la membrana del terminal axónico ante la llegada del potencial de acción, que provoca la apertura de canales iónicos dependientes de calcio. La entrada de estos iones dentro de la célula se traduce en una serie de cascadas de señalización que provocan la liberación de las vesículas sinápticas que contienen estos neurotransmisores. Una vez presentes en la hendidura sináptica, éstos son captados por la estructura postsináptica de la siguiente neurona. En función de su naturaleza, excitatoria o inhibitoria, los neurotransmisores producen, al unirse a sus receptores, una despolarización (siendo *excitatory postsynaptic potential, EPSP*) o hiperpolarización (*inhibitory postsynaptic potential, IPSPs*) local en la membrana de la neurona. La suma total de los *inputs* postsinápticos (PSPs) en esta segunda neurona determina la variación del potencial de membrana que provocará el disparo de potenciales de acción sólo si se alcanza el valor umbral (en inglés *threshold*) en el segmento inicial del axón. De esta manera, tanto la suma de los potenciales postsinápticos como de la necesidad de alcanzar un umbral para generar un potencial de acción, actúan como filtro para asegurar que sólo se da transmisión de la información que es más importante y no del ruido (Llinas, 1988, Kandel et al., 2000) (Fig. 9).



**Figura 9. Esquema representativo de las propiedades eléctricas de las neuronas.**

En el presente trabajo realizamos el estudio del segmento inicial del axón, la región celular con mayor concentración de canales de sodio dependientes de voltaje y de PSD-95, proteína fundamental en la estructura postsináptica.

## AIS

El segmento inicial del axon (AIS, *axon initial segment*) es una importante estructura que separa el soma de los compartimentos axonales en una neurona. El citoesqueleto que lo forma tiene como función mantener la polaridad neuronal, así como el mantenimiento de un correcto tráfico axonal (Winckler et al., 1999, Song et al., 2009). Asimismo, se caracteriza por ser una estructura con alta densidad de canales iónicos dependientes de voltaje de sodio ( $\text{Na}_v$ ) y potasio ( $\text{K}_v$ ) (Khaliq and Raman, 2006, Palmer and Stuart, 2006, Meeks and

Mennerick, 2007, Goldberg et al., 2008, Kole et al., 2008, Shah et al., 2008), por lo que en general es la estructura responsable de la integración final de los *inputs* sinápticos y la iniciación del potencial de acción. Estos canales están asociados a la membrana plasmática gracias al soporte por parte de las proteínas ankirina G y  $\beta$ IV espectrina que anclan la primera al citoesqueleto de actina (Garrido et al., 2003).

El AIS es una estructura extremadamente plástica y dinámica. Un aumento en su longitud supone un aumento en la excitabilidad de la neurona (mayor número de disparos) (Kuba et al., 2010), mientras que ante una gran actividad sináptica, se produce un cambio distal en la posición respecto al soma (Grubb and Nature, 2010).

Asimismo, el AIS es clave para la estabilidad neuronal y cognitiva. Se ha observado en modelos murinos que el déficit en cualquiera de sus principales proteínas estructurales causa ataxia y déficit de la generación de potenciales de acción, entre otros efectos (Zhou et al., 1998, Jenkins and Biol, 2001, Komada and Soriano, 2002, Lacas-Gervais et al., 2004, Yang et al., 2004, Pan et al., 2006). En un modelo *in vitro* de daño isquémico mediante privación de oxígeno y glucosa se han descrito fenómenos como la proteólisis del citoesqueleto del AIS así como pérdida de las proteínas que lo componen (como canales de  $\text{Na}_v$  o neurofascina). Tal fenómeno no es dependiente de la muerte celular de la neurona ni consecuencia de una degeneración axonal, si no que ocurre como consecuencia del daño neuronal (Schafer et al., 2009).

Puesto que la disrupción del AIS es un evento irreversible (Schafer et al., 2009), la degeneración axonal puede tener graves consecuencias neurológicas al afectar la excitabilidad neuronal, debido a la disminución de canales iónicos. Con todo ello, el AIS se configura como una estructura clave para el mantenimiento de la comunicación y transmisión neuronal.

## **PSD-95**

Los axones de las neuronas presinápticas liberan los neurotransmisores sobre la estructura postsináptica de las neuronas vecinas. Éstas son estructuras extremadamente dinámicas y especializadas que contienen multitud de proteínas para la detección de los neurotransmisores e iones liberados procedente del terminal axónico de la neurona presináptica y el posterior desencadenamiento de cascadas de señalización y transmisión sináptica. Una de las principales proteínas de estos botones postsinápticos es PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*). Se trata de una proteína de andamiaje que da soporte y estabilización a varias proteínas de señalización (Kim and Sheng, 2004). Entre sus papeles fundamentales para la funcionalidad sináptica se encuentra su unión y soporte al receptor

NMDA (Roche et al., 2001). Éste es susceptible de ser fosforilado en sus subunidades, afectando a la unión con el PSD-95 y por tanto, regular la composición en la sinapsis (Chen and Roche, 2007, Sanz-Clemente et al., 2010). Asimismo, es capaz de unirse de manera indirecta a los receptores AMPA y con ello modular las corrientes sinápticas (Chen et al., 2000, Nicoll et al., 2006, Bats et al., 2007). Existe una correlación entre la expresión de PSDs y el tamaño de estructuras postsinápticas, como las espinas dendríticas, y por lo tanto, con una mayor presencia de receptores postsinápticos de glutamato (Kasai et al., 2003), indicando que las sinapsis de mayor tamaño son más estables.

En resumen, este complejo estructural al ser capaz de unirse e interaccionar simultáneamente con moléculas de adhesión, receptores de glutamato y proteínas de señalización, juega un papel central en la maduración morfológica y funcional de las sinapsis en los sitios de contacto entre el axón y la dendrita (Han and Kim, 2008, Sheng and Kim, 2011).

En el contexto del AD, se ha observado en modelos de ratón transgénico que expresan la proteína APP humana, que además de presentar una disfunción cognitiva, existe una reducción en los niveles de PSD-95 (Almeida et al., 2005). Por otro lado, en muestras de pacientes de AD los resultados de distintas investigaciones han sido controvertidos. Mientras que algunos estudios hablan de un descenso en la expresión (Gyls et al., 2004, Love et al., 2006, Proctor et al., 2010) otros hablan de un aumento (Leuba et al., 2008a, Leuba et al., 2008b, Gong et al., 2009). Estas diferencias en los patrones de expresión pueden deberse a las distintas áreas del cerebro analizadas, siendo unas más vulnerables al desarrollo de la enfermedad, mientras que otras sufren un proceso compensatorio ante la degeneración (Savioz et al., 2014).

## **Disfunción sináptica y AD**

La disfunción sináptica y la pérdida neuronal selectiva son las características que mejor correlacionan con el declive cognitivo en AD (DeKosky and Scheff, 1990). Una extendida pérdida sináptica ha sido identificada en tejido cerebral de autopsias y biopsias de pacientes de AD mediante microscopía electrónica (Davies et al., 1987, Scheff et al., 1990, DeKosky et al., 1992, Scheff et al., 2006) y análisis inmunohistoquímicos y bioquímicos (Masliah et al., 1989, Terry et al., 1991, Honer et al., 1992, Dickson et al., 1995).

Todos estos estudios indican la pérdida sináptica como una de los rasgos neuropatológicos más tempranos en aparecer en el desarrollo de la enfermedad (Gibson, 1983, DeKosky and Scheff, 1990, DeKosky et al., 1992, Masliah, 1995, DeKosky et al., 1996, Hatanpää et al., 1999). Las perturbaciones en la integridad sináptica pueden ser detectadas



en pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI, *mild cognitive impairment*) (Masliah et al., 2001, Scheff et al., 2006), lo cual refuerza la idea de esta degeneración en la conectividad como característica prematura, antes incluso de la aparición de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (Arendt, 2009).

De todas las áreas analizadas, existen algunas, como el hipocampo, más vulnerables a esta degeneración que otras (Terry et al., 1991, Honer et al., 1992, Clinton et al., 1994, Masliah et al., 1994, Brun et al., 1995, Brown et al., 1998). Tal vulnerabilidad diferencial de la densidad sináptica correlaciona además con los patrones de degeneración por parte de los ovillos neurofibrilares, siguiendo los estados de Braak, que clasifican la progresión de la enfermedad en función de las áreas afectadas (Braak and Braak, 1991, Honer et al., 1992, Wakabayashi et al., 1994, Lue et al., 1996, Samuel et al., 1997, Heffernan et al., 1998). Se ha observado, como ejemplo, una reducción en los niveles de mRNA de sinaptofisina, importante en el tráfico de las vesículas sinápticas, en neuronas afectadas por estos ovillos de tau hiperfosforilado (Callahan et al., 2002).

Por otro lado, varios estudios no han sido capaces de describir una correlación entre la acumulación de placas seniles con la densidad sináptica en cerebros de AD (Scheff et al., 1990, Scheff and Price, 1993, Scheff and Price, 1998, Scheff and Price, 2003).

Estas alteraciones en la integridad neuronal presentes en los pacientes de AD, ya en las primeras etapas de la enfermedad, desembocan en patrones de conectividad aberrantes que se traducen en un grave deterioro cognitivo.

### **Conexión entre ciclo celular y función sináptica en neuronas**

Los progenitores neurales, una vez terminada su fase de proliferación, comienzan a diferenciarse en neuronas postmitóticas. Para ello, tiene que haber una coordinación perfecta entre los estímulos extracelulares y la maquinaria de ciclo celular, la cual debe bloquear sus procesos de entrada en un nuevo ciclo de proliferación. No obstante, una vez que la neurona madura, adquiere una morfología determinada y establece su polaridad, ¿cuál es el destino de todas aquellas moléculas protagonistas del ciclo en una situación de no retorno a un estado mitótico? Singularmente, desde hace algunos años se ha descubierto que muchas de estas moléculas que poseen un papel en la activación y progreso del ciclo celular, juegan papeles fundamentales en el control de la actividad sináptica (Frank and Tsai, 2009).

Un ejemplo de ello es p53, el cual se ha demostrado que es necesario para el crecimiento de neuritas y regeneración axonal (Giovanni et al., 2006). Las proteínas ORC,

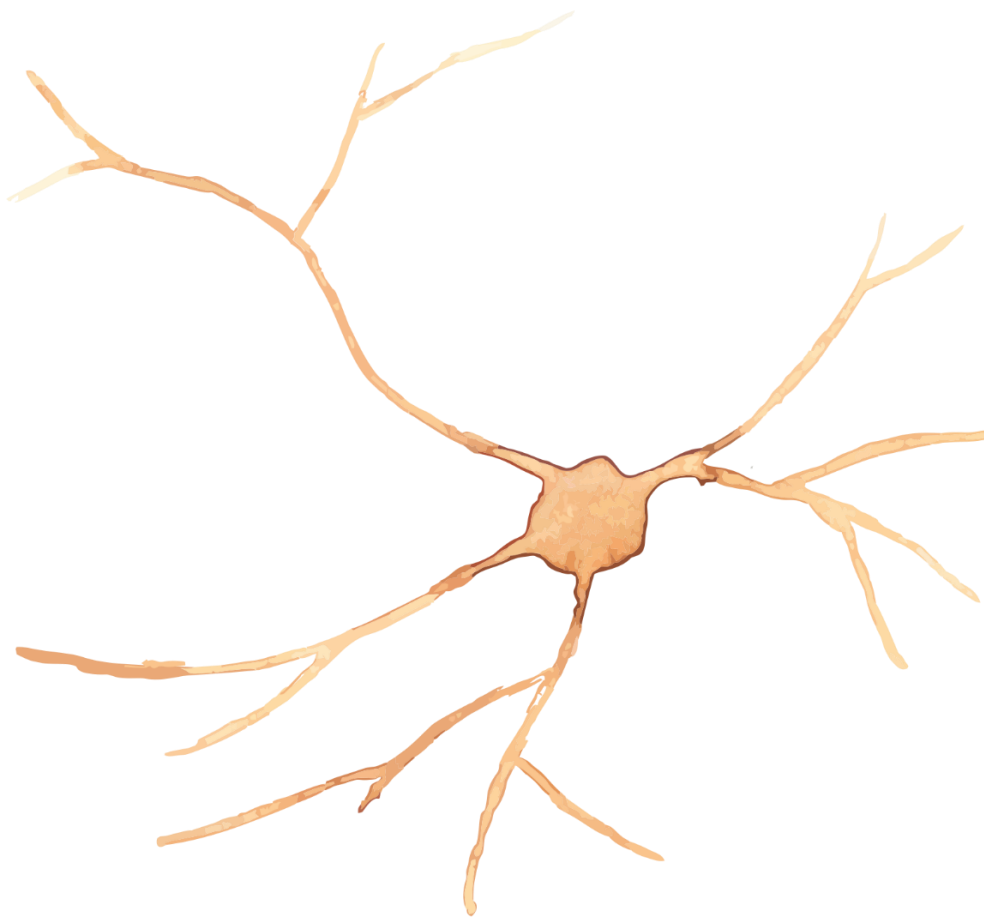
asimismo, además de ser imprescindibles para regulación del complejo de replicación del ADN, se han asociado con funciones de regulación del citoesqueleto para la morfología de las dendritas y sus espinas (Huang et al., 2005, Frank and Tsai, 2009). En contexto de una patología, la pérdida de funciones de ORC3 y ORC5 en neuronas hipocampales en cultivo se traduce en una reducción de la formación del árbol dendrítico y espinas dendríticas (Huang et al., 2005). En neuronas postmitóticas también se ha observado que el complejo APC/C<sup>Cdh1</sup> está involucrado en la supresión del crecimiento axonal (Konishi et al., 2004), así como en el mantenimiento de la plasticidad homeostática (Fu et al., 2011). La quinasa Aurora A es importante en la extensión de neuritas (Mori et al., 2009) y plasticidad neuronal dependiente de actividad de receptores de NMDA (Huang et al., 2002). Por otro lado, las *polo-like kinases* (Plks), juegan un importante papel durante la progresión de todos los pasos del ciclo y en estrés genotóxico (Barr et al., 2004). Tienen, además, funciones en la formación de espinas dendríticas y la plasticidad homeostática (Seeburg et al., 2008). Uno de los tándems más relevantes en este contexto es el formado por la ciclina E y Cdk5. Cdk5 se constituye como un importante regulador en la señalización pre- y postsináptica (Morabito et al., 2004, Trunova et al., 2011). La ciclina E, como se ha comentado anteriormente, constituye una de las moléculas clave para la regulación de la entrada y progresión a través de la fase S en el ciclo celular (Hwang and Clurman, 2005). En neuronas diferenciadas la ciclina E forma complejos con Cdk5 ejerciendo regulación sináptica al contener la actividad de esta última (Odajima et al., 2011). La eliminación de ciclina E desencadena una disminución en el número de sinapsis, reflejado en un menor volumen de espinas, que resulta en un bloqueo en la plasticidad sináptica y formación de memoria en animales deficientes de ciclina E (Odajima et al., 2011). Asimismo, un fenómeno de desregulación de la Cdk5, descrito en AD (Su and Tsai, 2011), se da cuando la proteína dependiente de calcio, calpaína, provoca la conversión de la proteína a la que está unido, p35, al fragmento neurotóxico p25 provocando hiperactivación de Cdk5 y con ello hiperfosforilación de tau (Kimura et al., 2014), entre otras cascadas que llevan a una neurodegeneración (Cruz and Tsai, 2004a, Cruz and Tsai, 2004b, Maestre et al., 2008, Su and Tsai, 2011).

Por tanto, la existencia de mecanismos moleculares compartidos indica una fuerte conexión entre el control del ciclo celular en neuronas “postmitóticas” y la regulación de la actividad y plasticidad sináptica, pudiendo ser la desregulación de ambos eventos clave para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el AD.





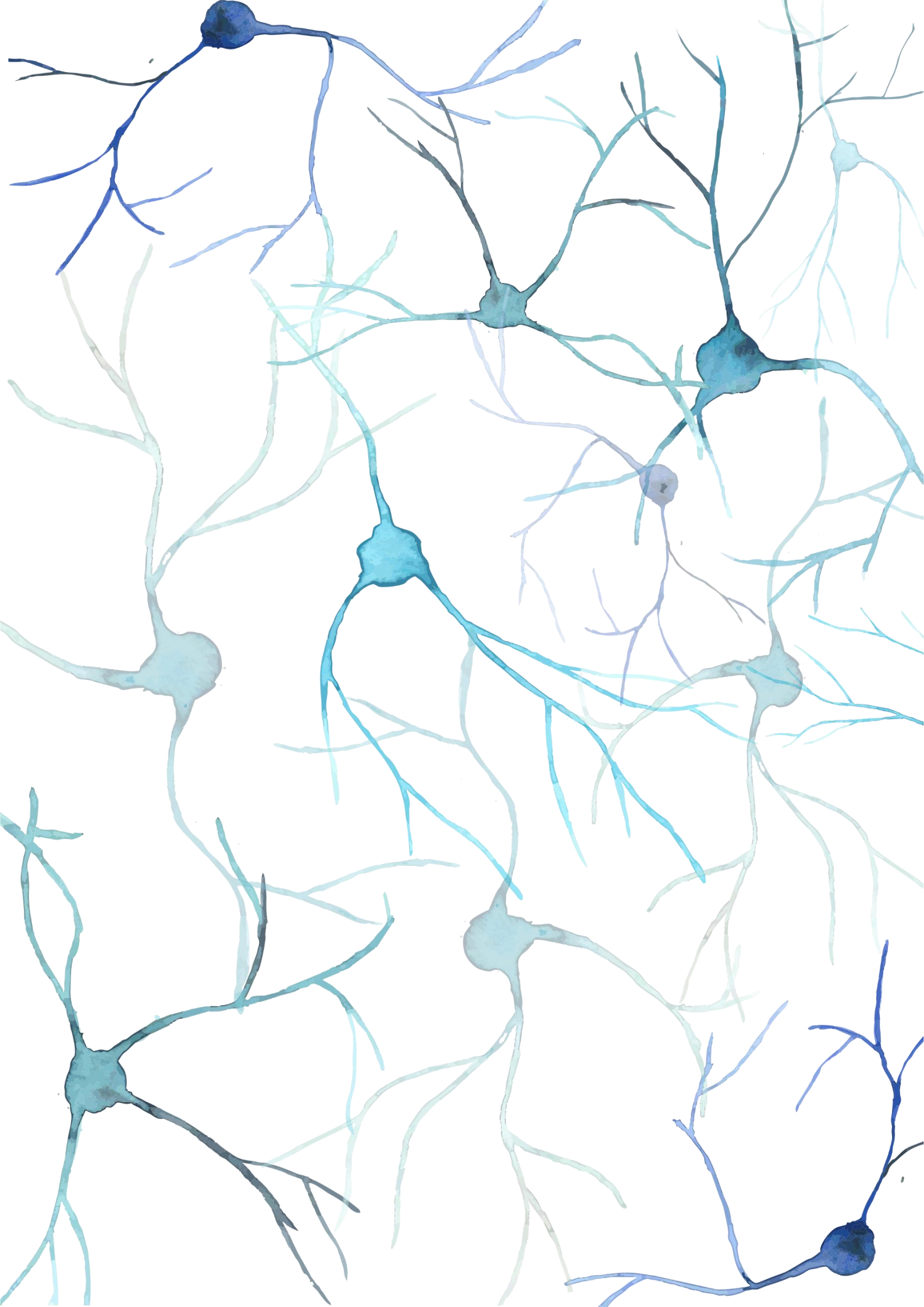
# OBJETIVOS



El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio de los efectos fisiológicos de la reentrada en ciclo en neuronas maduras como modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer.

Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la cinética de la reactivación del ciclo celular en neuronas corticales en cultivo mediante la expresión de TAg.
- Analizar el destino de las neuronas que han reactivado el ciclo celular mediante la expresión de TAg.
- Evaluar el efecto de la reentrada en ciclo en la maquinaria funcional sináptica de una neurona diferenciada.
- Estudiar el efecto del aumento de actividad eléctrica sobre las posibles alteraciones sinápticas observadas en las neuronas que reactivan el ciclo celular.
- Analizar el efecto de la presencia de neuronas hiperploides en una red neuronal mediante un modelo *in silico*.



A watercolor illustration of several neurons, showing cell bodies (soma) and branching dendrites and axons. The colors are various shades of blue and teal, with some darker spots on the cell bodies. The background is white.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## PLÁSMIDOS

Los plásmidos pSG5 Large T (Addgene #9053) y pSG5 Large T K1 (Addgene #9055) que expresan TAg y el mutante K1 TAg, respectivamente, fueron un regalo de William Hahn (Dana-Farber Cancer Institute). El plásmido pcDNA6/V5-His/LacZ se adquirió en Invitrogen (#V220-20V22001). El vector de expresión pRFPRNAiC, que expresa la proteína roja fluorescente (RFP), proviene de Stuart Wilson (Universidad de Sheffield, Reino Unido). El vector pEGFP-N1, el cual expresa la proteína verde fluorescente (EGFP), se obtuvo de Clontech. Los vectores lentivirales pLV-hSYN1-EGFP y pLV-hSYN1-EGFP-hSYN1-SV40 TAg se adquirieron de GeneCopoeia.

## ANTICUERPOS

El anticuerpo anti-BrdU de rata (mAb) [BU1/75 (ICR1)] (AbSerotec, RRID: AB\_323427) se utilizó a una dilución 1:200. El anti-NeuN de ratón (mAb) A60 (Millipore, RRID: AB\_2298772) se diluyó 1:1000. El anticuerpo de gallina anti-MAP2 se diluyó 1:15000 (ab5392, Abcam, RRID: AB\_2138153). El anticuerpo policlonal anti-fosfo Histona H3 (ser10) de conejo 06-570 (Millipore, RRID: AB\_10598489) se empleó a una dilución 1:500. El anticuerpo fosfo  $\gamma$ -H2AX (ser 139) monoclonal de ratón [9F3] (Abcam, ab26350) se empleó a una dilución 1:500. El anticuerpo anti-fluoresceína [6A4] monoclonal de ratón se utilizó a una dilución de 1:500 (Abcam, ab6213). El anticuerpo anti-Caspasa 3 activa de conejo se utilizó a una concentración de 1:400 (Cell Signalling Technology, RRID: AB\_2341188). El anticuerpo anti-GFP policlonal de conejo [A6455] (Invitrogen, RRID: AB\_221570) se empleó a una dilución 1:500. El anticuerpo anti-ankirina G de ratón antibody [N106/36] (NeuroMab, RRID: AB\_10673030) se diluyó 1:150. El anticuerpo anti-PSD-95 de ratón [7E3-1B8] (Abcam, RRID: AB\_221570) se utilizó a una concentración de 1:500.

## CULTIVO PRIMARIO NEURONAS CORTICALES MURINAS

Las neuronas primarias de corteza se obtuvieron de embriones de ratón CD-1 (Charles River), de sexo desconocido, a día embrionario E16-E17, como ha sido anteriormente descrito (Kaufman, 1992). Los embriones se decapitan y los cerebros se ponen en solución *Hank's balanced salt* (HBSS 1X) fría. Se extraen las meninges y se disecciona el cerebro con cuidado, separando el hipocampo de la corteza de cada hemisferio. Las cortezas se trocean y se incuban durante 18 minutos a 37 °C en medio HBSS con 2,5 mg/ml de tripsina (Gibco) y 1 mg/ml de DNAsa (Roche). Se retira el medio y se lava dos veces con HBSS nuevo, se retira otra vez y se añaden 7 ml de *Dulbecco's modified Eagle médium* (DMEM) (Thermofisher) con 10 % de suero fetal bovino (FBS) o suero de caballo inactivado (HS) (Life Technologies) para la inactivación total de la tripsina. A continuación,



se agitan los córtices 10 veces con pipetas Pasteur de distinto diámetro de punta (previamente flameada). Se deja que precipiten a la base del tubo *falcon* los restos de tejido más grandes y se pasa a otro tubo *falcon* 5 ml de sobrenadante, aspirado con cuidado de la parte más superficial. Se centrifuga a 1050 rpm durante 5 min a RT, se aspira el sobrenadante y el pellet se resuspende en DMEM/10 % FBS para el recuento de células y plaqueo. Las neuronas se plaquearon a distintas densidades (35.000 a 85.000 células/cm<sup>2</sup>) en cristales (Menzel Glässer, 10 mm) previamente recubiertos con 0,5 mg/ml de poli-orntina (Sigma-Aldrich). Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C. Dos horas más tarde, una vez que las neuronas han quedado adheridas al cristal, se añade medio Neurobasal suplementado con B27 (Thermo Fisher), GlutaMAX (Gibco) y penicilina-estreptomicina (P/S) (25 U/ml). A los 3-4 días se cambia la mitad del medio por medio nuevo. Para los experimentos de “pulso y caza” con BrdU, los cultivos se incubaban con BrdU (5 µg/ml) desde el principio del experimento, o a partir de determinados tiempos. En el caso de la despolarización crónica de las membranas de las neuronas en cultivo, se utilizó KCl (Merck) en una concentración final de 15 mM después de 2 días tras la transfección. Se probó que concentraciones mayores a 15 mM promueven la muerte celular (datos no mostrados).

### LIPOFECCIÓN

Se dejaron diferenciar los cultivos neuronales hasta los 6-8 días *in vitro* (DIV, *days in vitro*). Uno o dos días antes de la lipofección se cambia el medio con Neurobasal completo pero sin antibiótico. La transfección de ADN en las neuronas se llevó a cabo utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) (1 µg ADN/ 1 µl Lipofectamina 2000). Los plásmidos pSG5 Large T, pSG5 Large T K1, y pcDNA6/V5-His/LacZ se transfectaron combinados siempre con los plásmidos pRFPRNAiC o pEGFPN1 a un ratio de 19:1. En primer lugar se mezclan los plásmidos de interés (12,24 µg para una placa de p35) y el plásmido reportero (0,6432 µg para una placa de p35) con neurobasal. Por otro lado, se mezcla la lipofectamina (1:1) con neurobasal y finalmente se incuban la mezcla 20 minutos a temperatura ambiente para que se formen las partículas con el ADN, tiempo tras el cual se añade al cultivo. Después de 2 horas de incubación a 37 °C, se retira el medio de transfección, se hace un lavado con neurobasal solo y se añade mitad del volumen con medio completo nuevo y mitad con medio condicionado guardado antes de la transfección. El BrdU (5 µg/µl) se añadió al medio cuando correspondía. Las neuronas fueron mantenidas en cultivo de 1 a 7 días después de la transfección (*dpt*, días post transfección). Los niveles de incorporación de BrdU en respuesta a la expresión de TAg fueron idénticos independientemente del tiempo de diferenciación a la hora de transfectar (6-8 días).

## INMUNOCITOQUÍMICA

Los cultivos de neuronas corticales fueron fijados durante 15 minutos al 4 % de paraformaldehído (PFA) a temperatura ambiente, y permeabilizados durante 30 minutos con buffer de fosfato salino (PBS) que contiene 0,05 % Tritón X-100 (Sigma Aldrich) (PBTx). Para el inmunomarcaje de BrdU, el ADN se desnaturaliza 30 minutos a temperatura ambiente con 2N HCl/0,33x PBS y a continuación se neutraliza con 3 lavados de 15 minutos con 0,1 M borato de sodio pH 8,9. Tras esto se realizan lavados con PBTx de 5 minutos. Entonces los cultivos se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente con PBTx, que contiene 10 % de FBS, para bloquear la inespecificidad de la unión de los anticuerpos. Tras una hora de incubación con los anticuerpos primarios adecuados en PBTx 1 % FBS se realizan lavados con PBTx, y se incuban otra hora a temperatura ambiente en PBTx-1 % FBS con los correspondientes anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 *Goat Anti-rat* (H+L) (Life Technologies, RRID: AB\_2534074), Alexa Fluor 488 *Goat Anti-Mouse* IgG (H+L) (Life Technologies, RRID: AB\_2534088), Alexa Fluor 488-*conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit* IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, RRID: AB\_2535792), Alexa Fluor 594 *Goat Anti-Rabbit* IgG (H+L) (Life Technologies, RRID: AB\_2534095), Alexa Fluor 647 *Goat Anti-Chicken* IgY (H+L) (Life Technologies, RRID: AB\_2535866) o Alexa 647 *Donkey Anti-Mouse* IgG (H+L) (Life Technologies, RRID: AB\_162542) a dilución 1/1000. Después de realizar 4 lavados adicionales con PBTx, se realizó el marcaje de núcleos con PBS que contiene 100 ng/ml de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich). Las preparaciones se montaron con glicerol (Panreac)/PBS (1:1).

## CITOMETRÍA ESTÁTICA (*Slice-based cytometry, SBC*)

La cuantificación del ADN de las neuronas se llevó a cabo mediante la medición de la intensidad del DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), marcador fluorescente que se une a regiones del ADN enriquecidas en las bases nitrogenadas adenina y timina. Para ello, los cultivos primarios corticales se fijaron durante 15 minutos con PFA al 4 % y tras la inmunocitoquímica se marcaron durante 1 minuto con 100 ng/ml de una solución de DAPI preparada en PBS 1X. A continuación, se lavaron con PBS, y se montaron los cristales con las neuronas sobre un portaobjetos con glicerol/PBS (1:1). El marcaje de DAPI se obtuvo en condiciones de linealidad tanto en un microscopio Nikon E80i con una cámara digital DXM 1200 (Nikon) como en un microscopio confocal TCS SP5 (Leica), con el objetivo de magnificación 40X. La intensidad integrada del DAPI (intensidad/área analizada) se obtuvo como medidas arbitrarias ("*arbitrary units*", AU) y se cuantificó usando el software ImageJ (National Institute of Health, RRID: SCR\_003070). Un total de al menos 30 neuronas se analizaron para cada punto experimental. Se normalizaron los valores de intensidad de los

núcleos de las neuronas lipofectadas con neuronas control (no lipofectadas presentes en el mismo campo microscópico). Se consideraron neuronas hiperploides cuando la cantidad de ADN, intensidad/área de DAPI, estaba alrededor de 4C, donde C es el contenido de ADN presente en un gameto de esa especie, o mayor.

### *TUNEL*

La muerte programada de tipo apoptótico puede producir roturas de una ("nicks") o de doble hebra en el ADN genómico. Estas roturas de ADN pueden ser identificadas al marcar extremos 3' OH- terminales con nucleótidos modificados a través de una reacción enzimática. El kit de TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick end labeling*) empleado ha sido el *In Situ Cell Death Detection Kit*, Fluorescein (Sigma Aldrich). Contiene la enzima Terminal deoxynucleotidyl transferasa (TdT) que cataliza la polimerización de nucleótidos marcados (fluoresceína-dUTP) a extremos 3' OH- de ADN sin necesitar una hebra patrón. El marcaje de fluoresceína incorporada en los nucleótidos se detecta y cuantifica mediante microscopía de fluorescencia.

Se preparan una solución de permeabilización (0,1 % Tritón X-100 en citrato de sodio 0,1 %) y solución de DNAsa (50Mm Tris-HCl 7,5 pH 1 mg/ml BSA 0,5 mg/ml 3000 U/ml-3 U/ml). Primero se permeabilizan las células previamente fijadas con 4 % de PFA con la solución de permeabilización durante 2 min en hielo. Se lava 2 veces con PBS 1X. Para la preparación del cóctel de TUNEL, primero se retiran unos microlitros de la *Label Solution* para los controles negativos (50 µl por control). Se añade un volumen total de 50 µl de *Ezyme Solution* al resto del volumen de *Label Solution* para un volumen final de 500 µl de reacción. Por otro lado, se incuban algunas células con la solución de DNAsa durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT) para inducir roturas de ADN como control positivo. La incubación de todas las condiciones es a 37 °C durante 60 minutos. Se lava con PBS 1X tres veces y se procede a realizar la inmunofluorescencia anti-fluoresceína y anti-NeuN.

### *ANÁLISIS ESTRÉS OXIDATIVO*

El análisis de estrés oxidativo se llevó a cabo con la sonda fluorogénica *CellROX Green Reagent* (Thermo Fisher Scientific). El marcaje de la sonda tiene una fluorescencia débil en su estado reducido y exhibe una fluorescencia fotoestable en verde (absorción emisión máxima de unos 485/520 nm) cuando es oxidado por especies reactivas oxidativas (ROS, *reactive oxygen species*) y se une al ADN. Los experimentos se realizaron empleando un microscopio de fluorescencia *Time Lapse* (LEICA AF 6500-7000) a 37 °C 5 % CO<sub>2</sub>, donde se tomaron fotos a tiempo 0 (antes de añadir la sonda) y a tiempo 30 y 60 (30 y 60 minutos, respectivamente, después de añadir la sonda). La concentración final de la sonda era 5 µM.

En los controles positivos se añadían 100  $\mu$ M de agua oxigenada y en los controles negativos no se añadía sonda.

### REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo en cultivos de neuronas diferenciadas durante 8, 10 o 14 DIV (es decir, 0, 2 o 6 días post-transfección, *dpt*) sobre cristales, y consistieron en registros de tipo *whole-cell patch-clamp*. Se registraron una media de 12 neuronas por cada condición experimental. En primer lugar, las células se visualizaban con un microscopio Olympus BX50WI unido a un objetivo 40X de inmersión y óptica de infrarojos-DIC (campo claro). El medio extracelular en el que se mantenían los cristales con el cultivo tenía una composición (en mM) de: 124 NaCl, 2,69 KCl, 1,25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , and 10 glucosa, y con flujo de 95 %  $\text{O}_2$  / 5 %  $\text{CO}_2$  (pH = 7,3). La pipeta de *patch* tenía una composición (en mM) de: 130 K-gluconate, 10 NaCl, 1 EGTA, 0,133  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 3,5 MgATP, 1 NaGTP (pH=7,4). La resistencia de la pipeta variaba entre 3 y 5 M $\Omega$  y los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de temperatura de 37 °C y burbujeo de  $\text{CO}_2$ .

El potencial en reposo de la membrana fue estimado en la configuración de *whole-cell current clamp* a  $I=0$  inmediatamente después de la ruptura de la membrana. Para la evocación de potenciales de acción (PAs) se proporcionaron pulsos de corriente despolarizantes (50 pA *steps*, 1 s). La transmisión sináptica espontánea se obtuvo fijando las células a un potencial de membrana de -70 mV. La resistencia de la membrana se monitorizó mediante pulsos de -5 mV. Aquellos registros en los cuales el acceso de la resistencia cambiaba más de un 20 % durante el experimento se descartaron del análisis. Las señales se transmitían a un PC *Pentium-based* a través de un *DigiData 1440 interface board* (Molecular Devices). El software pClamp 10.2 (Molecular Devices, RRID: SCR\_011323) se utilizó para la visualización, adquisición y almacenamiento de los datos. Los registros electrofisiológicos en los cultivos de neuronas con presencia de KCl se llevaron a cabo con la composición del buffer estándar.

### ANÁLISIS DE IMÁGENES Y RECuento DE NEURONAS

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal TCS SP5 (Leica) con los objetivos 20X, 40X y 63X en función del experimento. Para los recuentos de neuronas totales transfectadas en el cultivo se tomaron imágenes aleatorias en campos de 385x385  $\mu\text{m}$  y se contaron las neuronas transfectadas con GFP o RFP que también fuesen NeuN positivas en esos campos. Para la estimación del número de neuronas transfectadas por cristal de 10 mm

de diámetro se asumió que siendo el área del cristal donde están las neuronas de un diámetro de 10 mm:

$$\text{Área del cristal} = \frac{\pi * \text{diámetro}^2}{4} = \frac{\pi * (10)^2}{4} = 78,53 \text{ mm}^2$$

$$\text{Área del campo de la imagen} = 385 \mu\text{m} * 385 \mu\text{m} = 0,148225 \text{ mm}^2$$

Si en “c” (número de campos tomados) hay un total de “n” (número de neuronas GFP/RFP+ NeuN+), en todo el cristal:

$$\text{Número estimado de neuronas transfectadas en todo el cristal} = \frac{n * 78,53 \text{ mm}^2}{c * 0,14}$$

#### ANÁLISIS DE PSD-95

Se tomaron imágenes en el microscopio confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de aceite de inmersión 63X 1,4 IMM, zoom de 3,2 a 1024x256 pixels en z stack de 0,5  $\mu\text{m}$  *step-size*. Las proyecciones máximas en el plano Z se utilizaron para analizar la densidad de marcaje de la proteína postsináptica PSD-95 dentro del área de la dendrita de la neurona transfectada marcada con la proteína fluorescente RFP. Todas las imágenes de las neuronas transfectadas con TAg y LacZ (control) se analizaron con funciones desarrolladas en el *software* Image J. A grades rasgos, en primer lugar se selecciona el canal en el que está la dendrita marcada con RFP y se realiza un suavizado y cambio de filtro *lut*. Ajustamos, si es necesario el área seleccionada de la dendrita para eliminar zonas erróneamente incluidas. Posteriormente se toma este área final de dendrita como área en la que se va a cuantificar el número de partículas marcadas con PSD-95, que previamente se ha convertido en binario. El número total de neuronas transfectadas analizadas en 3 experimentos diferentes fue de un mínimo de 81 por cada condición. En los experimentos en los que se medía el efecto de la despolarización crónica sobre la densidad de este marcador se añadió el KCl a una concentración final de 15 mM en el segundo día post transfección, igual que en los experimentos de electrofisiología.

#### ANÁLISIS DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

La longitud y el pico de intensidad de la fluorescencia del AIS (*axon initial segment*) se evaluó mediante el marcaje específico de anti-ankirina G (AnkG). Se tomaron imágenes de 1024x1024 pixels en z *stacks* de 0.5  $\mu\text{m}$  *step-size* en el microscopio confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de aceite de inmersión 63x 1.4 IMM. A continuación, se obtuvo la máxima proyección en el eje Z. Basándonos en *scripts* descritos en Matlab (Mathworks) (Grubb and Nature, 2010, Evans et al., 2015), se desarrollaron funciones personalizadas en Image J para nuestro análisis particular. En primer lugar, el marcaje de AnkG se suavizó

utilizando un filtro Gaussian Blur 1, se extrajo el fondo utilizando un *threshold* y la imagen se convirtió en binaria. Se procesó utilizando funciones *open-close* para quitar discontinuidades y se obtuvo un "esqueleto del AIS" de 1 pixel de ancho. Manualmente se extendió la línea desde el marcaje del MAP2 en el soma hasta pasado el final del marcaje del axón por AnkG. Los valores de intensidad de la fluorescencia a lo largo de la línea dibujada se promediaron en 3x3 píxeles alrededor del pixel de interés (1 pixel = 0,24 µm) y se suavizó utilizando un promediado simple del *plugin* BAR (≈ 2 µm). Estos valores entonces se normalizaron entre 0 (el mínimo valor de fluorescencia suavizado) y 1 (el máximo valor de fluorescencia suavizado) utilizando la siguiente fórmula:  $y_2[i] = (y_1[i] - \min) / (\max - \min)$ , donde  $y_1$  es el valor suavizado de fluorescencia original e  $y_2$  el valor normalizado. La posición de inicio y fin del AIS se obtuvo a partir del perfil normalizado, cuando el valor sobrepasa y decae de 0.33, criterio previamente descrito (Grubb and Nature, 2010). El valor del pico de fluorescencia de AnkG (VPF) se obtuvo previo a la normalización de la intensidad. Asimismo, tanto la longitud del AIS como la de los VPF se normalizaron a los valores correspondientes a las neuronas no transfectadas adyacentes. El número total de neuronas transfectadas analizadas en 4 experimentos diferentes fue 196.

#### MODELO RED NEURONAL

Se ha diseñado un modelo de red neuronal de tipo "*integrate-and-fire*" (Lapicque, 1907, Knight, 1972) (Fig. 12). A grandes rasgos, cada neurona del modelo posee un potencial de membrana ( $V$ ) gobernado por la ecuación diferencial:

$$\tau \frac{dV}{dt} = -(V - V_0)$$

donde tau es la constante de tiempo de membrana, que parametriza el tiempo que tarda la neurona en alcanzar su potencial de reposo ( $V_0 = -49$  mV). A su vez, el potencial de membrana puede ser perturbado por corrientes sinápticas despolarizantes e hiperpolarzantes. Las conductancias ( $g_e$  y  $g_i$ ) de tales corrientes sinápticas siguen las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dg_e}{dt} = -\frac{g_e}{\tau_e}$$

$$\frac{dg_i}{dt} = -\frac{g_i}{\tau_i}$$

El valor de  $g_e$  y  $g_i$  depende de la cantidad de sinapsis excitatorias e inhibitorias activas, respectivamente, según su peso sináptico. El peso de las sinapsis excitatorias es de +2 mV y el de las inhibitorias de -9 mV. Un potencial de acción (PA) procedente de la sinapsis  $s$  en el tiempo  $t$ , induce un cambio del  $V$  en la neurona  $j$ :  $V \rightarrow V + w_s$ , donde  $w_s$  es el peso de la sinapsis  $s$ . De este modo, si  $s$  es una sinapsis excitatoria, la neurona  $j$  se despolariza +2 mV a una velocidad definida por  $\tau_e$ . Y por el contrario, ante una sinapsis inhibitoria su  $V$  se mueve -9 mV, a una velocidad goverada por  $\tau_i$ .

Cada neurona inicializa  $V$  en un valor elegido al azar entre -50 a -60 mV y comienza a recibir sinapsis excitatorias e inhibitorias con sus correspondientes pesos. Si el valor de  $V$  llega a -50 mV, la neurona dispara un PA, que induce las consiguientes corrientes sinápticas en las células a las que está conectada. En este punto, existe un periodo refractario de 5 ms en el cual la neurona no puede volver a disparar. Nótese que el potencial de membrana de las células está por encima a su umbral de disparo, por tanto se trata de células intrínsecamente activas.

La red está compuesta por 4000 neuronas de 2 tipos: células excitatorias e interneuronas inhibitorias. A su vez, el modelo considera dos subtipos excitatorios: i) células excitatorias propiamente dichas, y ii) células líderes. Las características de estos tipos celulares son las siguientes:

i) Interneuronas inhibitorias: Conectadas al resto del circuito con 0.2 de probabilidad (1 de 5) y con sinapsis inhibitorias. Poseen una constante de tiempo de membrana rápida (9 ms), lo que les confiere una frecuencia de disparo alta. Su potencial de membrana en reposo es -49 mV. Suponen el 10 % de la población celular.

ii) Células excitatorias (propiamente dichas): Conectadas al resto del circuito con 0.1 de probabilidad (1 de 10) y con sinapsis excitatorias. Poseen una constante de tiempo de membrana media (20 ms). Como el anterior tipo celular su potencial de membrana en reposo es -49 mV. Son el 85 % de la población.

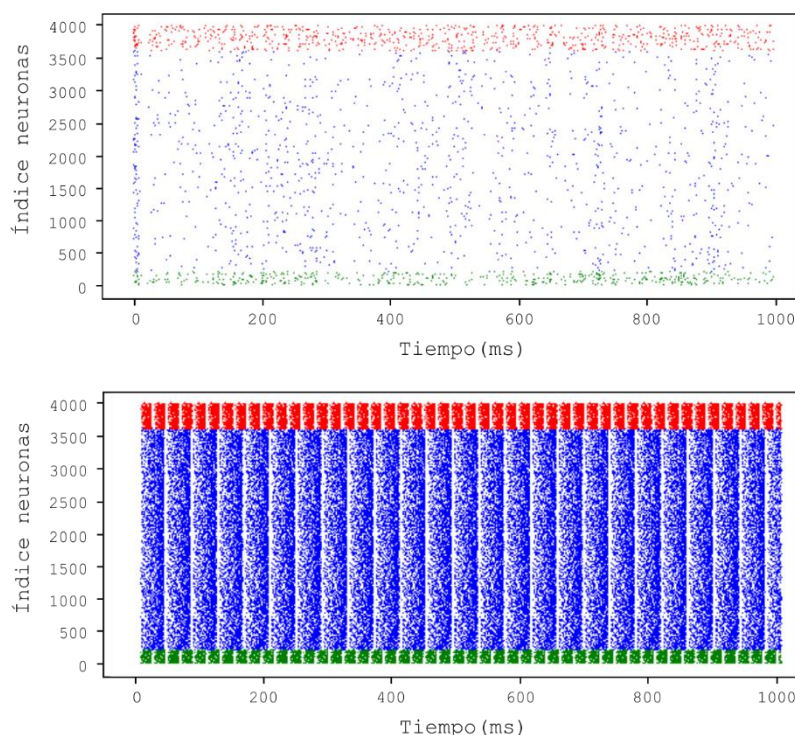
ii) Células líderes. Subtipo de células excitatorias cuya conectividad es igual al resto de células excitatorias (0.1), pero cuyo potencial de membrana está 3 mV más despolarizado, y por tanto presentan una frecuencia de disparo mayor. Son el 5 % de la población total celular.

Los parámetros establecidos en el modelo suponen un comportamiento moderadamente fisiológico evaluado según su frecuencia de disparo: la mayoría de las células excitatorias presentan una frecuencia de disparo inferior a 1 Hz (excitatorias propiamente dichas), una minoría de células excitatorias tienen una frecuencia de disparo

entre 1-5 Hz (líderes), y la población inhibitoria presenta una frecuencia de disparo de alrededor de 2 Hz.

Para la implantación de un porcentaje de neuronas con incapacidad de disparar PAs (hiperploides), y por lo tanto, neuronas “silenciosas”, se incorporó en la ecuación diferencial del modelo un término corrector negativo *dam* (daño, del inglés *damage*). Éste tiene un valor igual a -30 mV, que hiperpolariza el potencial de membrana de estas células, alejándolas de su umbral de disparo ( $V_t$ ). Los porcentajes de neuronas hiperploides implementados fueron 1, 10, 20, 30, 50 y 80 %.

Se comprobó que la red neuronal simulada tiene una fuerte dependencia sináptica en sus patrones de actividad. De hecho, si se retiran todas las conexiones sinápticas entre las neuronas, la red presenta un régimen de disparo sincrónico, que únicamente refleja el componente exponencial que repolariza  $V$  (Fig. 10).

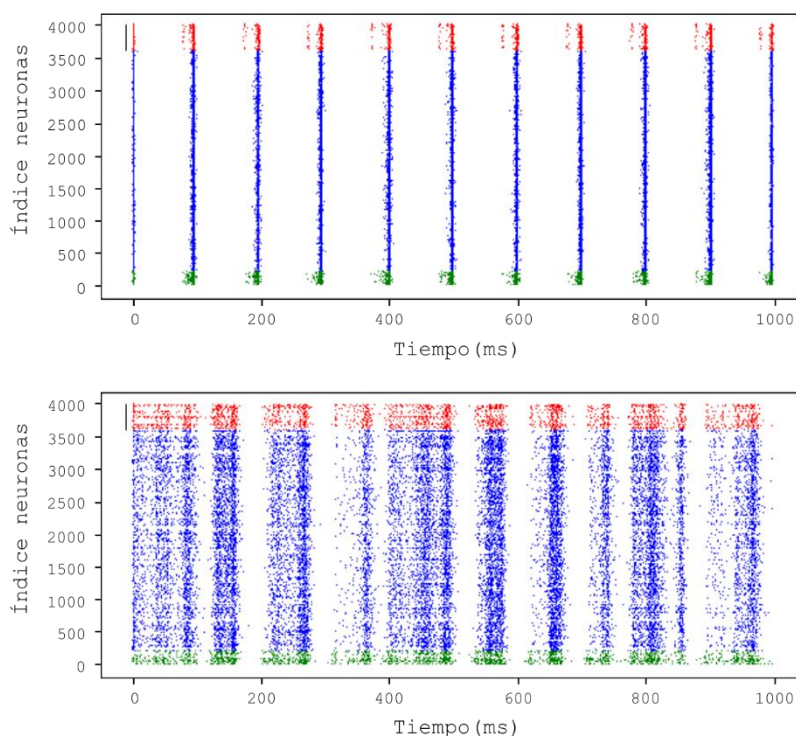


**Figura 10. El comportamiento de la red neuronal simulada es fenomenológicamente dependiente de las sinapsis configuradas.** Cada punto individual de la gráfica representa el disparo de PA de una neurona (enumeradas de la 0 a la 4000 en el eje de las ordenadas) a lo largo de todo el tiempo de la simulación (1 segundo). La red se subdivide en tres: las interneuronas (rojo), las neuronas excitatorias (en azul) y las neuronas líder (en verde). Se comparan una red control funcional (panel superior) con otra en la que se han eliminado todas las sinapsis (panel inferior).

En los resultados no se ha considerado analíticamente el efecto de silenciar la subpoblación de interneuronas, que tal y como esperábamos deviene en una red epiléptica



(Fig. 11), con patrones de actividad hipersincrónicos, muy distintos al resto de los efectos en las otras poblaciones.



**Figura 11. Ejemplos representativos de simulaciones con porcentajes de neuronas hiperplóides (50 % y 80 %) en la subpoblación de las interneuronas.** Las interneuronas (rojo), neuronas excitatorias (azul) y neuronas líderes (verde) están representadas por cada punto de la gráfica. Se observan patrones de disparo ultrasincrónico, de tipo epiléptico.

El programa empleado para el diseño de la red neuronal ha sido Brian (Goodman and Brette, 2008, Goodman and Brette, 2009, Stimberg et al., 2017), basado en lenguaje de programación Python. El código completo de este modelo neuronal descrito se adjunta en **Anexo I**.

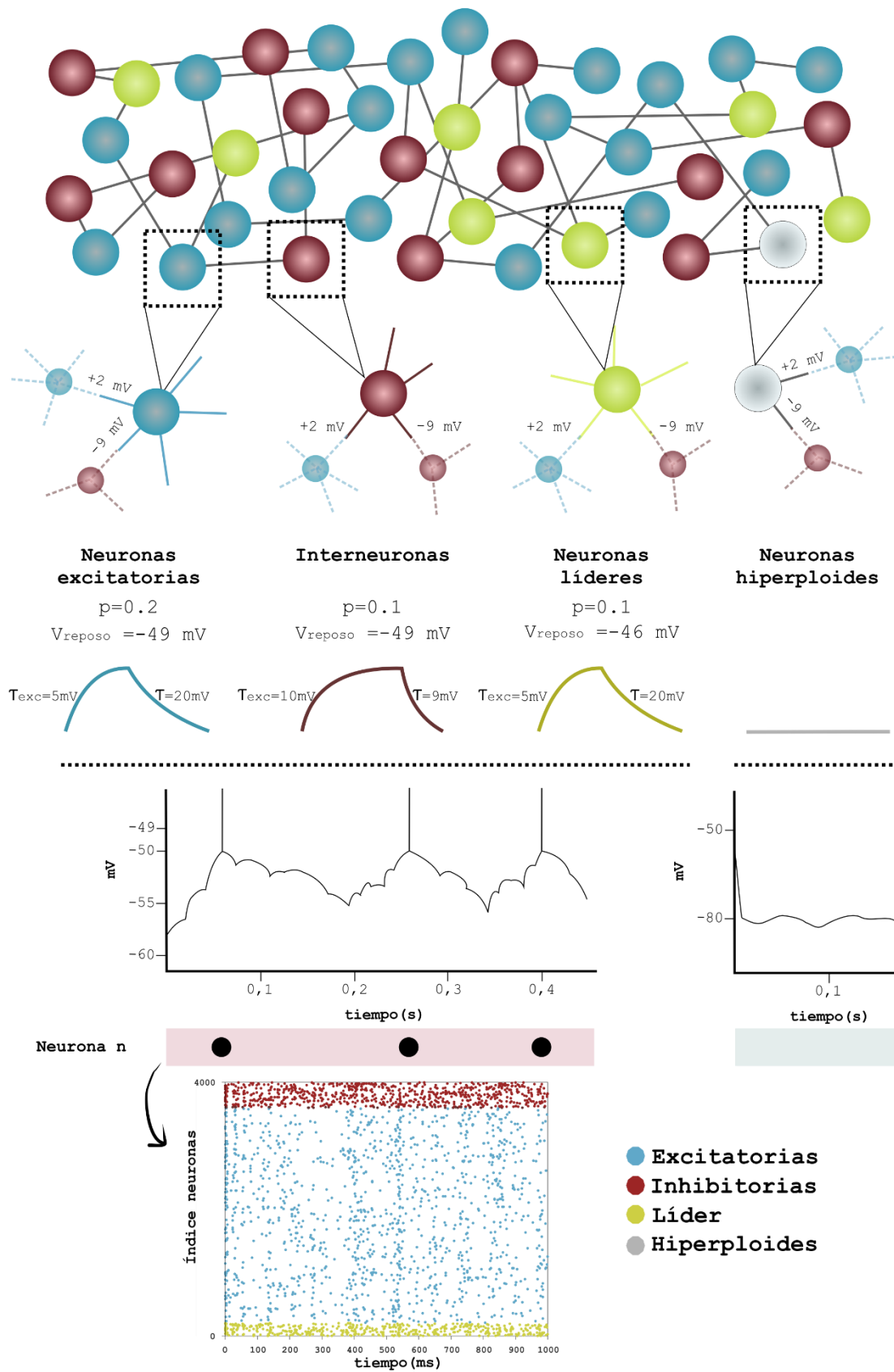
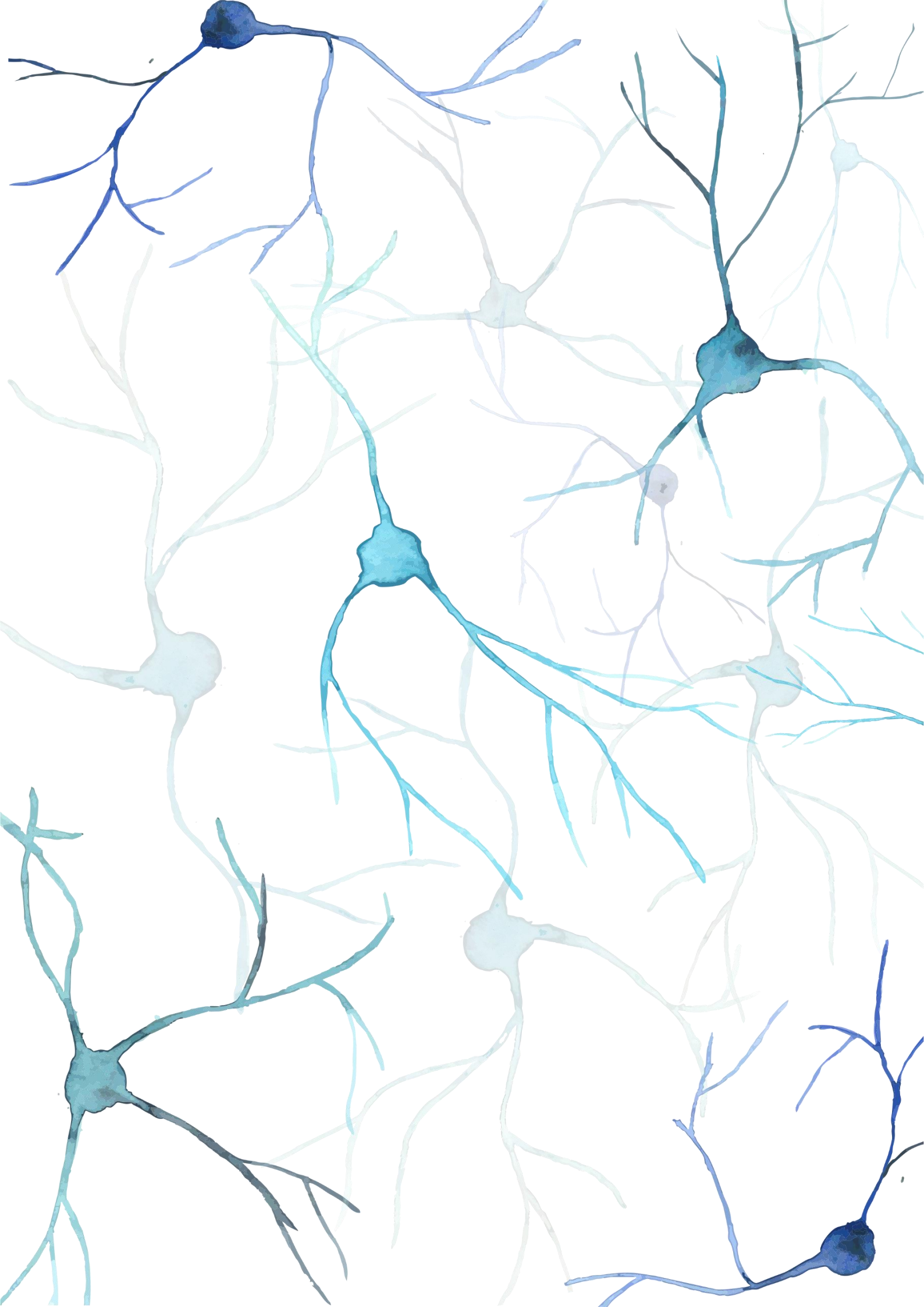


Figura 12. Esquema del diseño del modelo de red neuronal de hiperploidización.

## DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicaron test de normalidad previo a realizar las comparaciones estadísticas, las cuales consistieron en el test Mann-Whitney *rank sum* no paramétrico, ANOVA paramétrico seguido de test *post hoc* de *Tukey's honestly significant difference* o de Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas, correlaciones de Pearson, test no pareado t de Student. Los análisis se realizaron en SigmaPlot 13.0 (Systat Software) o MATLAB (MathWorks). Los datos cuantitativos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) a partir de al menos 3 experimentos independientes. En las figuras del modelo neuronal se representa media  $\pm$  intervalo de confianza del 95 % (estimado como  $1,96 \times$  error estándar). Los valores exactos del valor p así como el test utilizado para cada experimento se describe en el texto y/o en las respectivas leyendas de las figuras. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron con  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), y  $p < 0.001$  (\*\*\*)



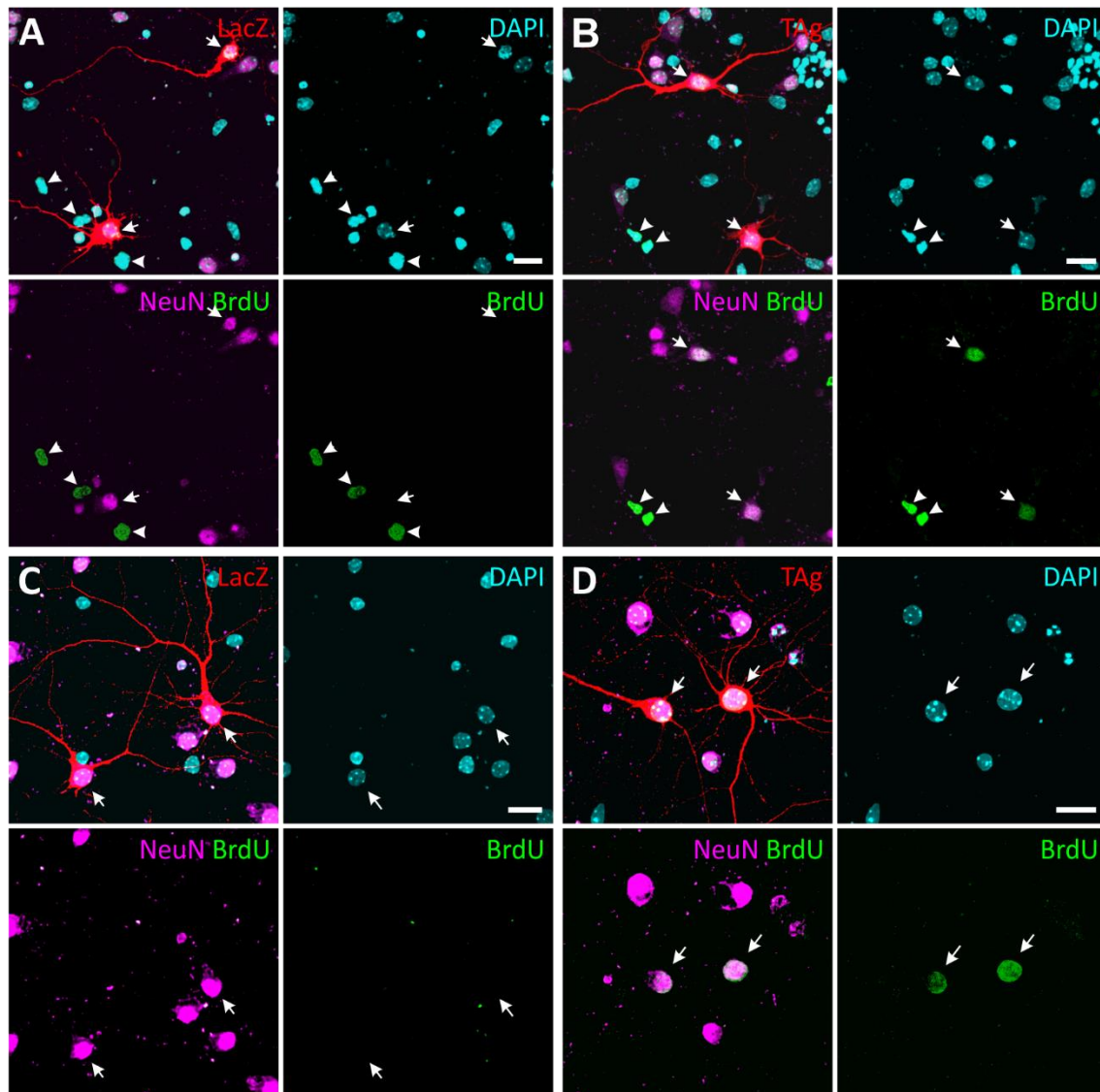
A watercolor illustration of several neurons in various shades of blue and teal. The neurons have cell bodies (soma) and branching processes (dendrites and axons) that spread across the page. The style is soft and artistic, with visible brushstrokes and a gentle color gradient.

# RESULTADOS

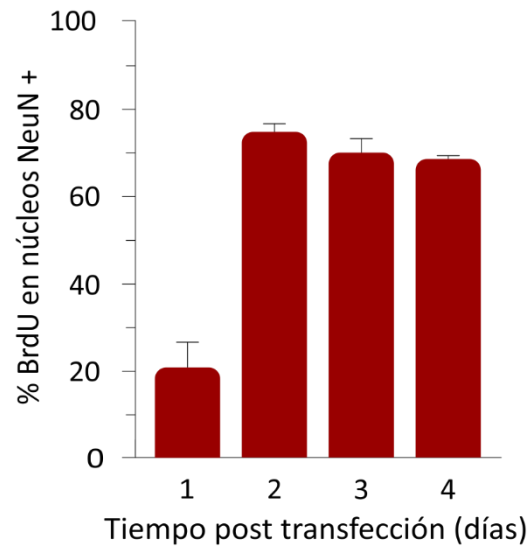
## **TAg induce síntesis de ADN e hiperploidía en neuronas corticales**

En primer lugar determinamos si la expresión del oncogén TAg es capaz de forzar la entrada en ciclo celular en neuronas maduras. Se cultivaron neuronas corticales de ratón *in vitro* durante 6-8 DIV. Seguidamente, se transfectaron con una mezcla de plásmidos compuesto por una proteína reportera, RFP, y un plásmido control (LacZ) o un plásmido que contiene el TAg. Estas neuronas transfectadas se mantuvieron en presencia del nucleósido análogo de la timidina, BrdU, el cual se incorpora durante la replicación del ADN en la fase S del ciclo celular. A continuación se realizó un doble marcaje inmunocitoquímico frente a NeuN, marcador de neurona madura (Mullen et al., 1992), y BrdU en diferentes días después de la transfección. El análisis de incorporación de BrdU reveló que tanto las neuronas no transfectadas como las neuronas transfectadas con el plásmido control (LacZ/NeuN positivas) no incorporan este nucleósido en ninguno de los tiempos analizados (**Fig. 13 A y C**). Sin embargo, una proporción de neuronas transfectadas con TAg sí mostraron marcaje positivo específico contra BrdU (**Fig. 13 B y Fig. 14**) a partir de un 1 dpt. Este porcentaje de incorporación de BrdU alcanza el 70 % al segundo día tras la transfección, porcentaje que se mantiene durante los 3 y 4 dpt (**Fig. 13 D y Fig. 14**). Resultados similares se obtuvieron cuando se llevó acabo el mismo análisis pero utilizando otro marcador de neuronas maduras, la proteína de citoesqueleto MAP2 (**Fig. 15**). Como control de la expresión de TAg en las neuronas marcadas con RFP, se comprobó mediante inmunocitoquímica que el 97 % de las neuronas RFP positivas, eran TAg positivas (**Fig. 16**). Estos resultados indican, por tanto, que es posible la reentrada en el ciclo celular en neuronas NeuN positivas inducida mediante la expresión de TAg.

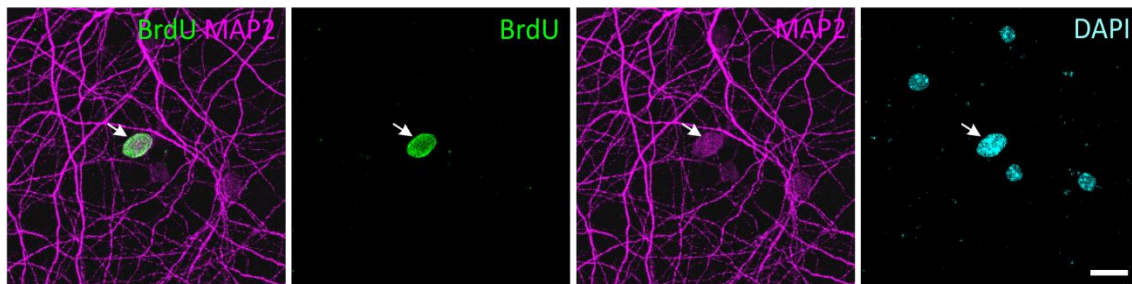




**Figura 13. La expresión de TAg en neuronas corticales maduras induce reentrada en ciclo celular.** Neuronas corticales transfectadas con RFP/LacZ (A) 1 día post transfección y (C) 2 días post transfección (flechas). Las neuronas que expresan LacZ (en rojo) que son NeuN positivas (magenta) no incorporan BrdU (verde). Por otro lado, células NeuN negativas que incorporan BrdU (punta de flecha), corresponderían con otro tipo celular no neuronal. El ADN está marcado con DAPI (azul). Neuronas corticales transfectadas con RFP/TAg (B) 1 día post transfección y (D) 2 días post transfección (flechas). Las neuronas que expresan TAg (en rojo) que son NeuN positivas (magenta) son capaces de incorporar BrdU (verde). El ADN está marcado con DAPI (cyan). Las imágenes mostradas son proyecciones de una serie del microscopio confocal. Escala: 20  $\mu$ m.

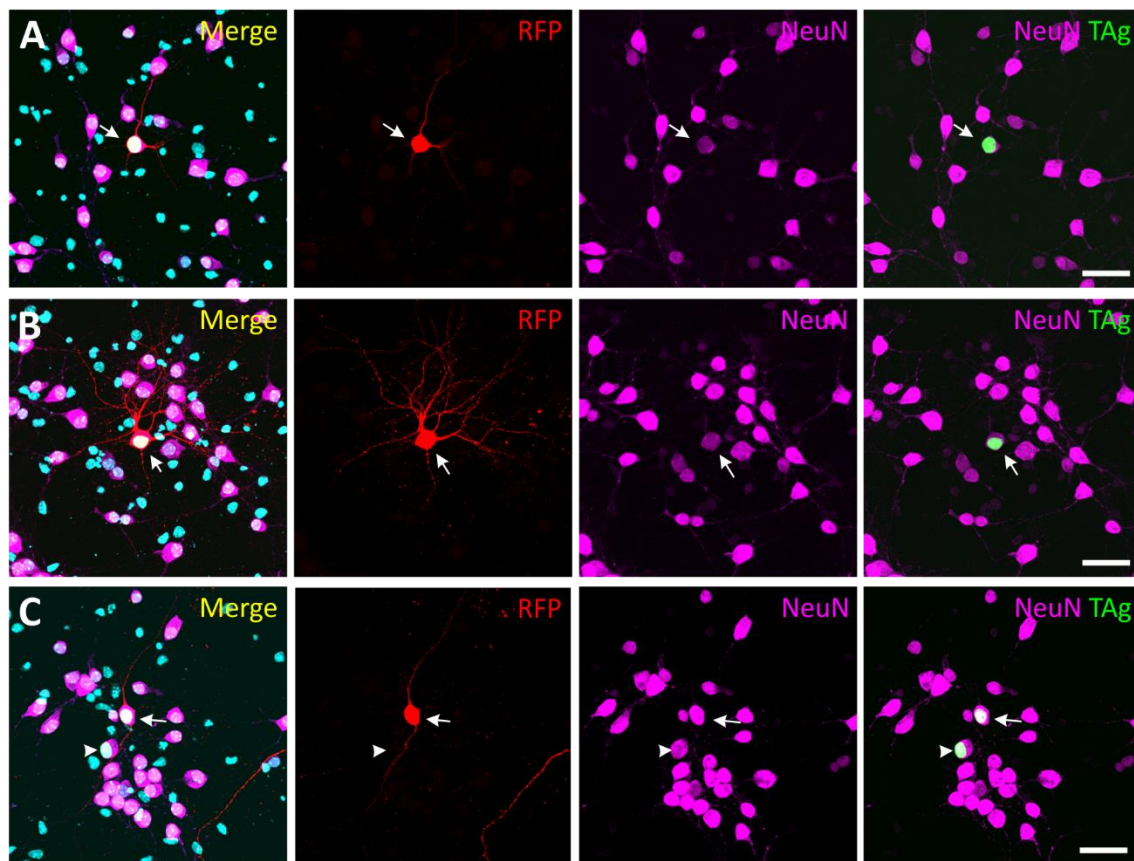


**Figura 14. TAg induce replicación de ADN en una subpoblación grande de neuronas transfectadas.** Porcentaje de incorporación de BrdU por parte de neuronas corticales transfectadas con RFP/TAg en distintos tiempos tras la transfección. Las barras de error representan la SEM. El número de células analizadas fue  $n = 6642$  de  $N = 4$  experimentos independientes.



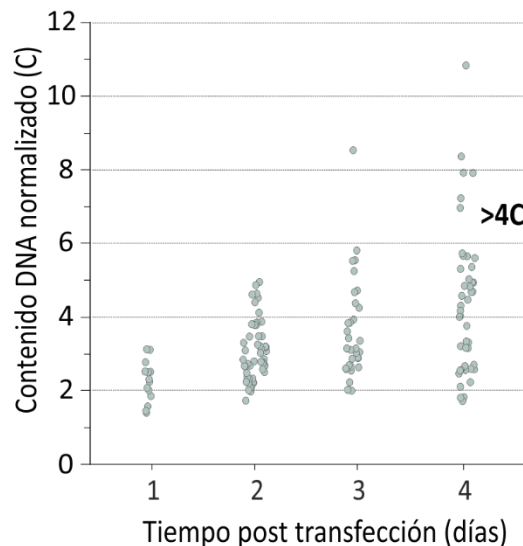
**Figura 15. La reentrada en ciclo en neuronas corticales maduras mediante la expresión de TAg se comprobó también con el marcador MAP2.** Imágenes de confocal representativas de cultivo de neuronas transfectadas con TAg. Se muestra una neurona MAP2 positiva (magenta), BrdU positiva (verde) a 7 dpt (flecha). El ADN está marcado con DAPI (azul). Las imágenes mostradas son proyecciones de una serie del microscopio confocal. Escala: 20  $\mu\text{m}$ .





**Figura 16. La mayoría de las neuronas RFP positivas, NeuN positivas, también son TAg positivas.** Se muestran tres ejemplos distintos de proyecciones de confocal. Las neuronas transfectadas con RFP/TAg (rojo (flecha)) están marcadas con el marcador neuronal NeuN (magenta) y TAg (verde). Nótese en C la presencia de una neurona transfectada TAg positiva pero sin el reportero RFP (punta de flecha). Escala= 20  $\mu$ m. Recuento de n=105 de N=1 experimento.

Para determinar si la incorporación de BrdU va acompañada de cambios en contenido de ADN de estas células, se cuantificaron los niveles de DAPI (marcador de ADN) en las neuronas transfectadas positivas para BrdU, normalizando con los valores de marcaje de DAPI en neuronas no transfectadas (**Fig. 17**). En este análisis se observó un aumento en el número de neuronas con contenido en ADN de en torno a 4C (donde C es el contenido en ADN presente en un gameto de esa especie, en este caso, una neurona no transfectada tiene contenido de ADN de 2C) a partir del segundo día tras la transfección. Este aumento progresa hasta observarse neuronas con núcleos con cantidad de ADN superior a 4C, lo cual sugiere un posible proceso de endoreplicación en algunas neuronas que han reentrado en ciclo. En conclusión, nuestros resultados indican que la incorporación de BrdU por parte de las neuronas corticales se traduce en un aumento gradual de los niveles de ADN en dichas células. Paralelamente, existe una pequeña subpoblación de neuronas transfectadas que, a pesar de incorporar BrdU, mantienen un contenido cerca del diploide (**Fig. 17**).

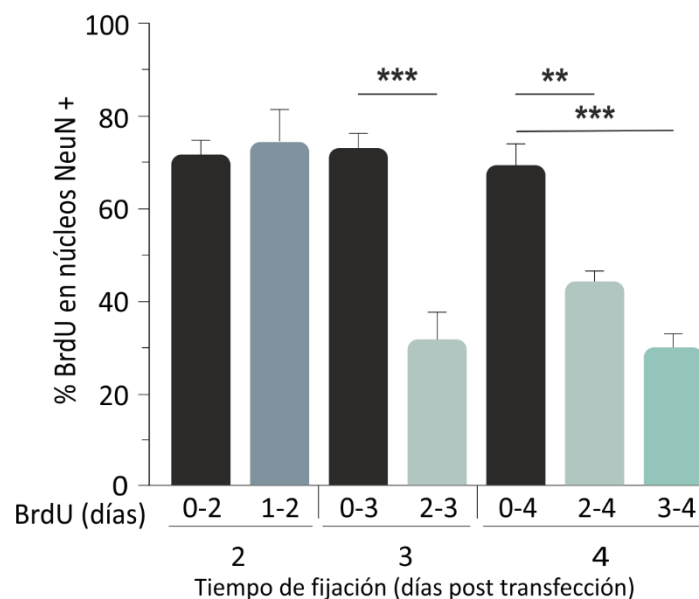


**Figura 17. La expresión de TAg induce hiperploidía en neuronas corticales.** Cuantificación del contenido de ADN mediante la medición del área del núcleo en las neuronas transfectadas RFP/TAg que son BrdU positivas y normalizadas con la media del contenido en ADN de las neuronas no transfectadas en los mismos campos microscópicos en los mismos tiempos analizados. El número total de neuronas analizadas fue n=282 de N=5 experimentos independiente.

Con el objetivo de conocer cuál es el patrón de replicación de ADN por parte de las neuronas diferenciadas se llevó a cabo un experimento de pulso y caza (en inglés *pulse and chase*). En este experimento se añadió la concentración de BrdU a tiempo 0 (justo después de la transfección) o a partir de 1,2 y 3 dpt, siendo las neuronas fijadas al cabo de 2, 3 o 4 dpt según se ilustra en la **Fig. 18**. Alrededor de un 30-40 % de las neuronas son capaces de seguir incorporando BrdU después de 2 dpt, lo que sugiere que hay una subpoblación de neuronas capaz de entrar en un ciclo endoreplicativo. Estos resultados concuerdan con los del análisis de la **Fig. 17**, que muestran la presencia de neuronas hiperploides.

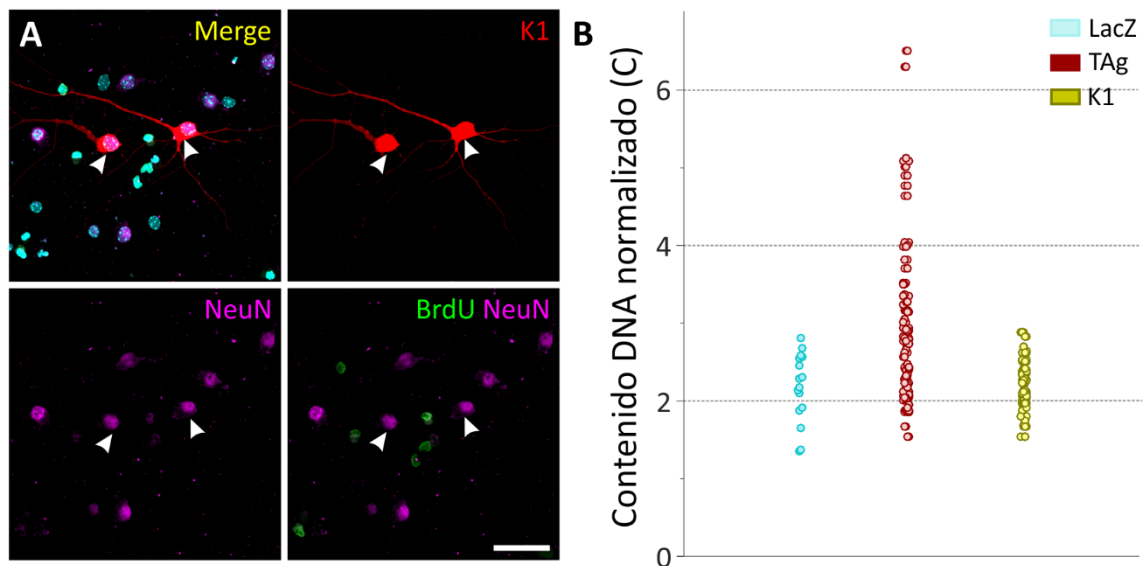
Todos estos resultados mostraron que una gran población de las neuronas corticales en cultivo a las que se les fuerza el ciclo con el TAg necesitaron más de un día para iniciar la replicación de su ADN, mientras que otras incorporan BrdU al cabo del primer día (**Fig. 18**).

En conjunto, los resultados indican que tras la reentrada en ciclo las neuronas corticales pueden replicar su ADN una única vez, llegando a tener un contenido de ADN tetraploide; entrar en ciclos endoreplicativos, adquiriendo un contenido mayor de 4C o hiperploide; o permanecer con contenido diploide (2C).



**Figura 18. Experimento *pulse and chase* de incorporación de BrdU en neuronas transfectadas con TAg/RFP y fijadas en distintos tiempos.** El número de células analizadas fue n= 2772 de N= 3 experimentos independientes.

Con el objetivo de identificar el efecto directo de la reentrada en ciclo mediante TAg en neuronas se transfectaron con una variante de la proteína TAg caracterizada por la mutación E107K (K1). Esta mutación impide la unión de la proteína TAg a la familia de las proteínas del retinoblastoma, y por lo tanto, las neuronas transfectadas con K1 no son capaces de incorporar BrdU, por lo que los niveles de contenido en ADN no aumentaron (**Fig. 19**), al contrario de lo que ocurre en las transfectadas con TAg. A partir de este momento se utilizó la expresión de la proteína K1 en la mayoría de los experimentos como control adicional. Su utilización permite distinguir los efectos de la proteína TAg independientes de ciclo celular de los provocados por la reentrada en ciclo en neuronas.

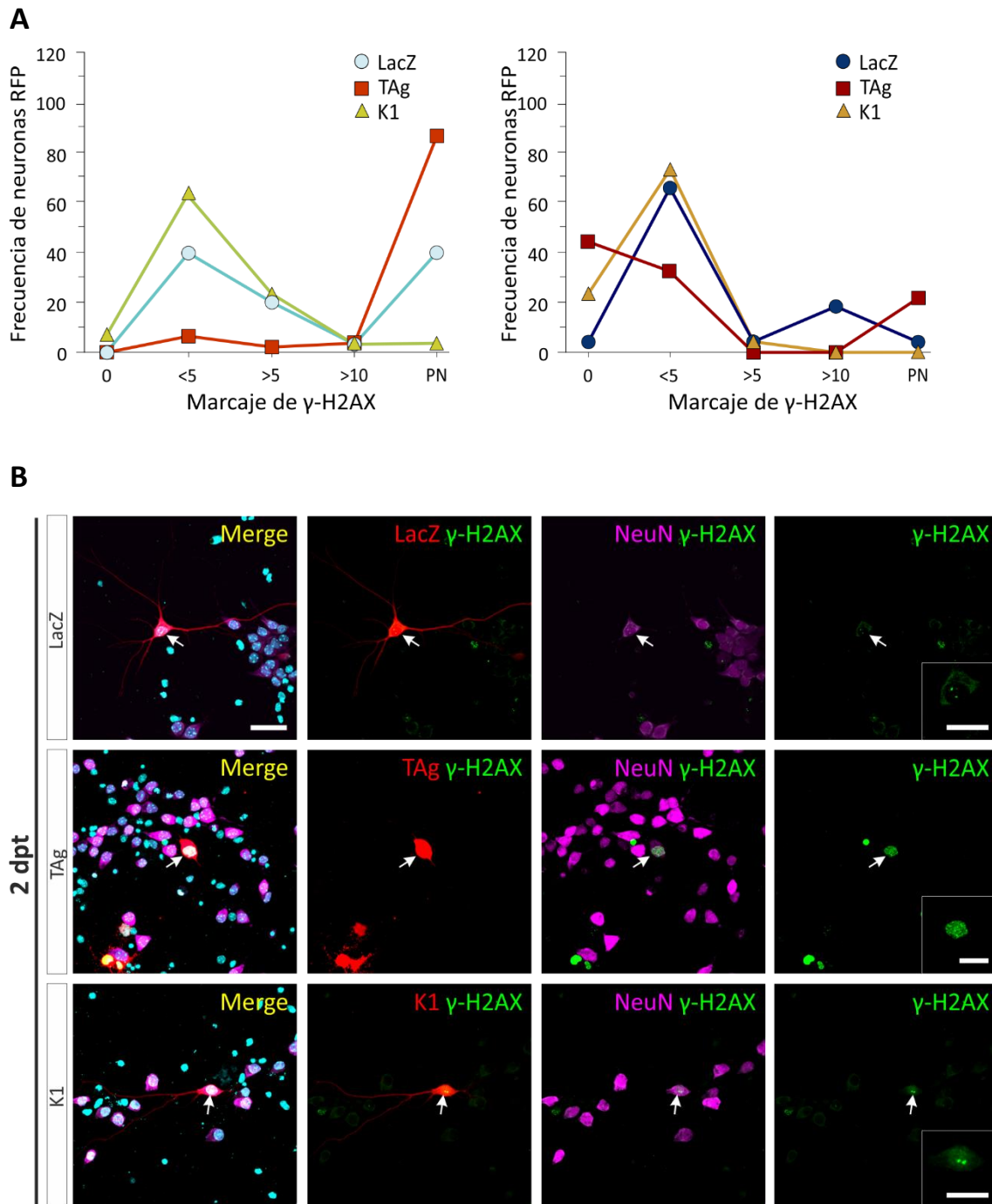


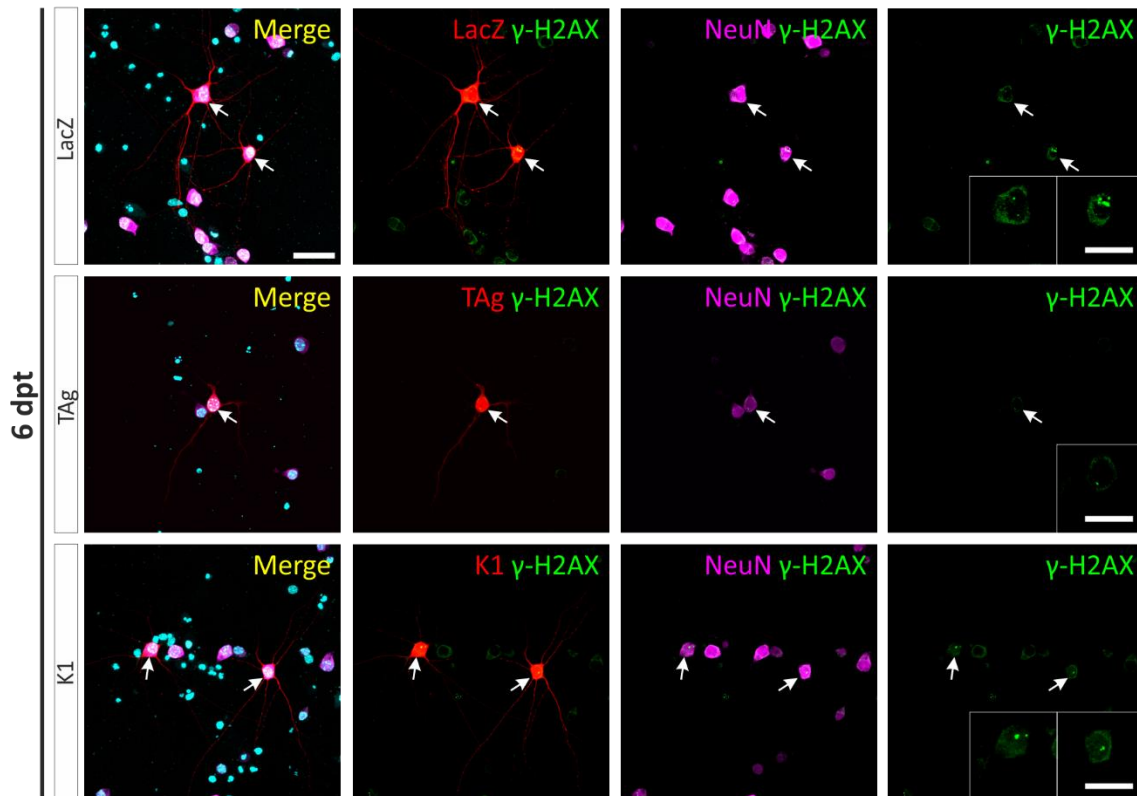
**Figura 19. Las neuronas transfectadas con el mutante K1 no sufren aumento en su cantidad de ADN, ni son capaces de incorporar BrdU.** (A) Neuronas corticales transfectadas con RFP/K1 a 2 dpt. Las neuronas que expresan K1 (rojo) que son NeuN positivas (magenta) no incorporan BrdU (verde) (punta de flecha). Por otro lado, células NeuN negativas que incorporan BrdU corresponderían con otro tipo celular no neuronal. El ADN está marcado con DAPI (azul). Las imágenes mostradas son proyecciones de una serie del microscopio confocal. Escala: 40  $\mu$ m. (B) Se muestra el contenido de ADN (C) a 2 dpt de las neuronas corticales RFP positivas transfectadas con LacZ-, TAg- o K1, normalizado con la cantidad de ADN promedio de las neuronas no transfectadas de los mismos campos microscópicos. Cada punto representa la cantidad de ADN normalizada para una sola neurona NeuN positiva. N=3 experimentos.

### Las neuronas que reactivan el ciclo sufren daño genómico

La activación aberrante de replicación del ADN puede inducir la respuesta ante daño genómico (*DNA Damage Response*, DDR) y como consecuencia activar la parada en el *checkpoint* G<sub>2</sub> (Poehlmann et al., 2011). Para detectar una posible activación de DDR en las neuronas a las que se les ha forzado el ciclo utilizamos el análisis de  $\gamma$ -H2AX fosforilado en la serina 139, marcador de DDR. Se cuantificó el número de neuronas RFP positivas (transfectadas con TAg, LacZ o mutante TAg-K1) que bien no tuviesen foci de  $\gamma$ -H2AX o bien tuviesen de 1-5, 6-10, más de 10 focos o marcaje pan-nuclear a 2 y 6 dpt. Este análisis mostró que a 2 dpt (momento del pico de replicación de ADN) la mayoría de las neuronas corticales transfectadas con TAg presentan marcaje pan-nuclear, en comparación con los dos controles, los cuales presentan menos de 5 focos (**Fig. 20 A y B**). Este resultado sugiere una mayor activación de la maquinaria de DDR. Curiosamente, a este tiempo, las neuronas transfectadas control LacZ también presentan este tipo de marcaje pan-nuclear. Esto podría deberse al estrés generado por la propia transfección. Sin embargo, las neuronas control K1 no presentan este marcaje, descartando por tanto el efecto del estrés de la transfección. Cabe destacar que a los 6 dpt, la mayoría de las neuronas transfectadas con TAg no

presentan focos de  $\gamma$ -H2AX o un número menor de 5, perfil similar a los controles (**Fig. 20 A y B**). Esto puede deberse a que a este tiempo la mayoría de las neuronas que han reentrado en ciclo se han ido muriendo, lo cual explicaría este cambio en el perfil del daño genómico sufrido por estas neuronas corticales.





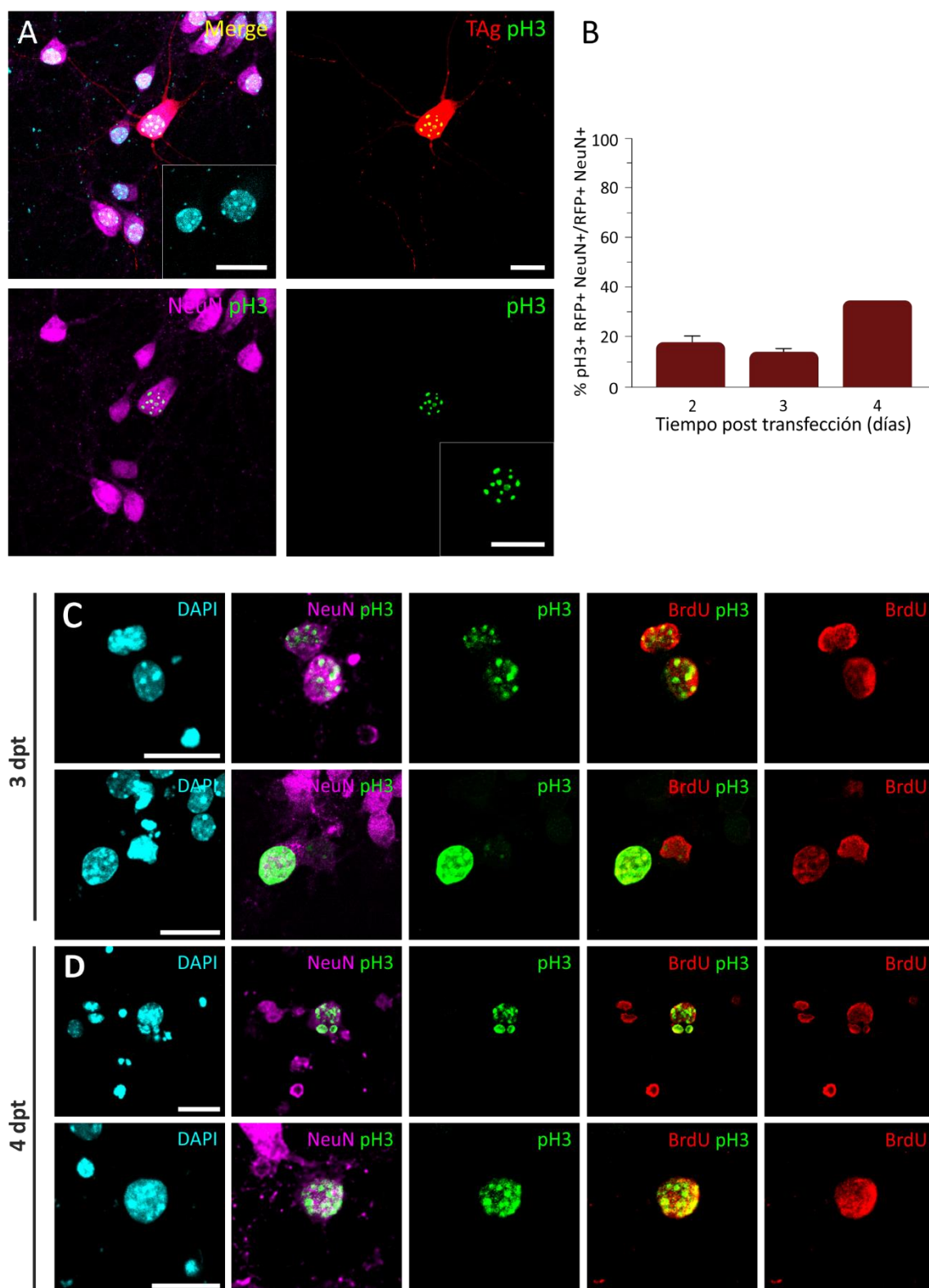
**Figura 20. Presencia de marcador de daño genómico en neuronas que han reactivado ciclo.** (A) Perfil de frecuencias de número de neuronas (magenta) RFP con distinto número de focos o marcaje pan-nuclear de  $\gamma$ -H2AX (verde) a los 2 y 6 dpt en las tres condiciones: neuronas transfectadas con TAG que reactivan ciclo, y los controles LacZ y TAG-K1 (rojo). (B) Imágenes representativas de proyecciones de confocal de los marcajes predominantes (flechas) en cada una de las condiciones y tiempos. Escala = 40  $\mu$ m. Los núcleos con el marcaje de  $\gamma$ -H2AX están ampliados en los recuadros de la derecha. Escala = 20  $\mu$ m. Recuento de n=158 de N=1 experimento

### Una población de neuronas que han reactivado ciclo se encuentra en fase G<sub>2</sub> avanzada

Para obtener una aproximación sobre la fase del ciclo en la que podrían encontrarse las neuronas una vez atravesado la fase S (donde se observa la incorporación de BrdU) tras la expresión de TAG, analizamos la presencia de la histona H3 fosforilada en la serina 10 (pH3) en las neuronas RFP y BrdU positivas. La fosforilación de dicha histona formando focos se ha demostrado que correlaciona con el inicio de la condensación de la cromatina, anterior a la entrada en mitosis (Hendzel et al., 1997). Los resultados de este análisis a 2, 3 y 4 dpt mostraron la presencia de marcaje punteado o formando focos en un  $18,16 \pm 7,81$  % a 2 dpt,  $13,94 \pm 2,43$  % a 3 dpt y  $34,62 \pm 1,28$  % a 4 dpt de las neuronas transfectadas con RFP, lo cual indica que un porcentaje sustancial de neuronas transfectadas con TAG ha alcanzado el final de la fase G<sub>2</sub> (**Fig. 21 A y B**). Además determinamos que el marcaje en forma de focos de pH3 colocaliza con el de BrdU, lo cual confirma que estas neuronas han reactivado el ciclo y se encuentran en fase S previa a la entrada en fase G<sub>2</sub>. Asimismo, de



manera puntual y esporádica, pudimos identificar marcaje de tipo pan-nuclear en algunas neuronas transfectadas con TAG, lo cual puede sugerir una probable entrada en profase (ejemplo en la segunda fila de imágenes a 3 dpt) (**Fig. 21 C y D**).



**Figura 21. Presencia del marcador histona H3 fosforilada en Ser10 como identificador de fase G<sub>2</sub> tardía.** (A) Imágenes de proyecciones de confocal de neuronas transfectadas con TAG/RFP y

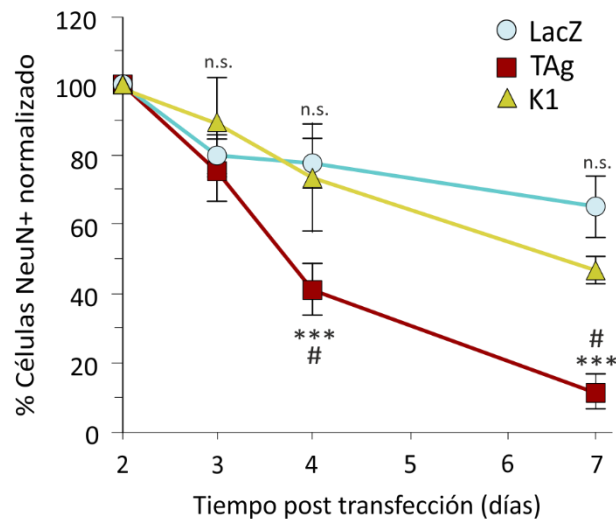
fijadas a 3 dpt donde se observa la presencia de focos de pH3 (verde) indicando fase G<sub>2</sub> tardía. En la ampliación se muestra el marcaje de ADN con DAPI (azul) donde se observa un mayor tamaño de núcleo en la neurona transfectada con TAg en comparación con la neurona no transfectada de al lado. Escala= 20 µm. (B) Porcentaje de neuronas transfectadas con TAg/NeuN ± SEM que presentan marcaje de pH3 a los 2, 3 y 4 dpt. Recuento de n= 857 de N=2 experimentos. (C) y (D) Imágenes de proyecciones del microscopio confocal representativas del marcaje punteado de pH3 (verde) de neuronas (magenta) transfectadas con TAg a 3 y 4 dpt con marcaje de BrdU (rojo) indicando que, una vez atravesada la fase de replicación, se encuentran al final de la fase G<sub>2</sub>. El ADN de las neuronas está marcado con DAPI (azul). Escala= 20 µm.

## **La reentrada en ciclo en neuronas induce muerte celular progresiva independiente de cascada apoptótica clásica o estrés oxidativo**

Numerosos estudios (Busser et al., 1998, Freeman et al., 1994, Kruman, 2004) han demostrado que la muerte neuronal es el último destino de las neuronas que reactivan su ciclo celular. Por esta razón decidimos investigar si nuestro modelo de reentrada en ciclo asistida por TAg induce en último término la muerte celular. Para ello, se realizó un recuento del número absoluto de células RFP/NeuN positivas a diferentes tiempos en los cultivos transfectados con los diferentes plásmidos. Estos valores se normalizaron tomando como referencia el número absoluto de neuronas transfectadas a 2 dpt para cada condición, momento en el que ocurre la máxima incorporación de BrdU en las neuronas transfectadas con TAg (**Fig. 22**). Al cabo de 3 dpt no se observaron diferencias significativas entre la supervivencia de las neuronas transfectadas con TAg y las control transfectadas con LacZ. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo el porcentaje normalizado del número absoluto de neuronas transfectadas con TAg se reduce de forma progresiva y significativa en comparación con el control.

A continuación, se realizó el mismo análisis de supervivencia en neuronas transfectadas con el plásmido K1, y se observó que el patrón de supervivencia era similar al de las neuronas transfectadas con el control LacZ (**Fig. 22**). Estos resultados demuestran que la muerte provocada por TAg es debida a su efecto específico sobre el ciclo celular y no sobre otros posibles efectos de la molécula. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la reentrada en ciclo de neuronas diferenciadas conlleva una muerte neuronal progresiva.



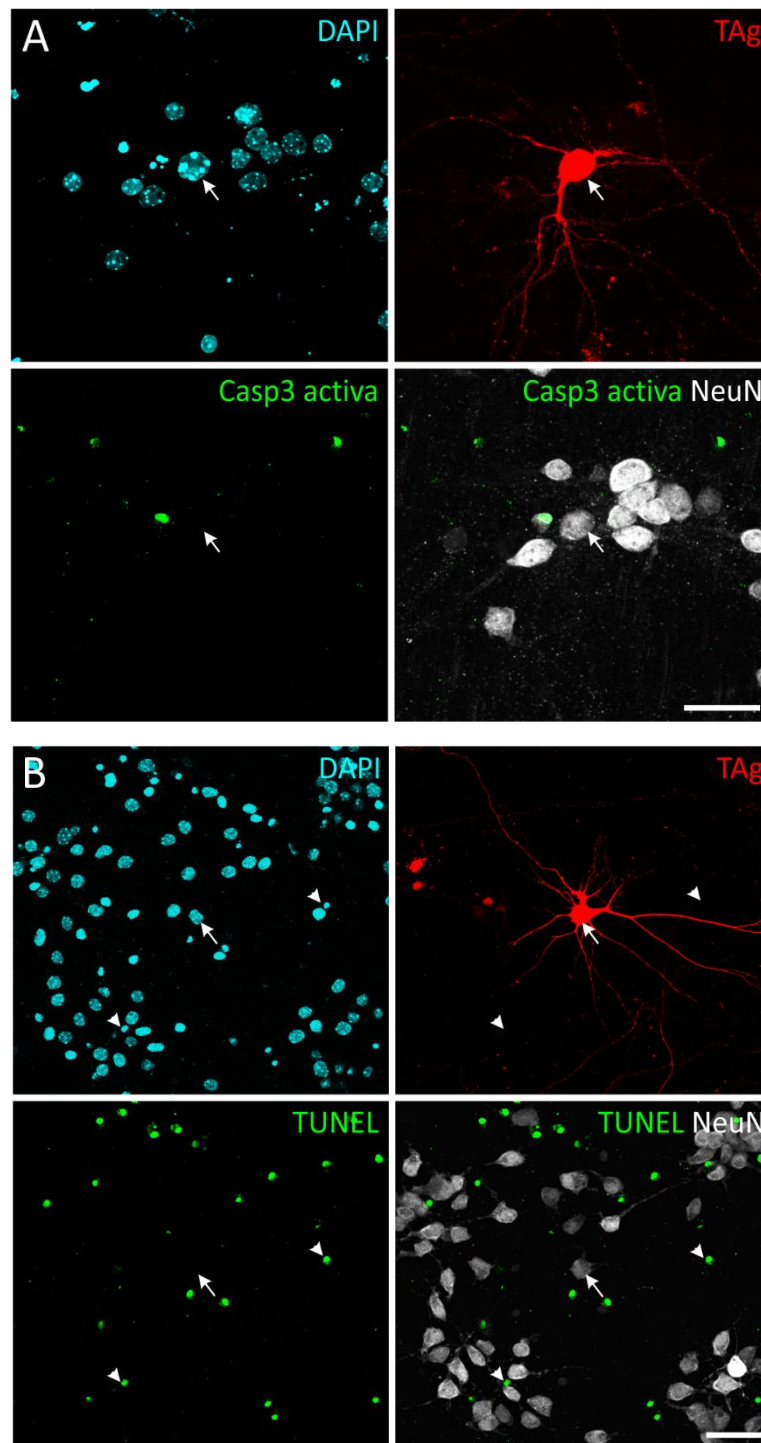


**Figura 22. La reentrada en ciclo en neuronas provoca muerte neuronal progresiva en el tiempo dependiente de la reactivación de ciclo celular.** Número absoluto de neuronas transfectadas con RFP y LacZ (control) o K1 (mutante de TAg que no permite la reentrada en ciclo) en distintos días, normalizado con el número de neuronas transfectadas de cada condición a los 2 dpt. Las barras de error muestran la SEM. N= 5-10 experimentos independientes. El \* indica diferencias significativas entre TAg y LacZ y el # indica diferencias significativas entre TAg y K1. Nótese que no existen diferencias significativas entre los dos tipos de neuronas transfectadas control con LacZ y K1. \*\*\*p < 0.001 y #p < 0.05.

A continuación se quiso determinar qué tipo de muerte celular sufren las neuronas que han reactivado el ciclo celular. Decidimos evaluar si estas neuronas sufren apoptosis. Para ello, en primer lugar se realizaron dobles marcajes por inmunocitoquímicas a 2, 3, 4 y 7 dpt contra anti-NeuN y anti caspasa 3 activa, indicador de activación de la ruta apoptótica dependiente de la ruta Bcl-Bax (Hengartner, 2000). En esta cuantificación se encontraron tan solo 2 neuronas de 233 analizadas con marcaje positivo para caspasa 3 activa (**Fig. 23 A**). Una de las características de los últimos estados del proceso apoptótico es la fragmentación del ADN en fragmentos de 180 pares de bases. La técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) permite la detección de estos fragmentos al marcar los extremos 3' OH con una molécula fluorescente (Anglada et al., 2016). Por ello, en segundo lugar, para determinar si las neuronas que habían reactivado el ciclo estaban sufriendo un proceso de tipo apoptótico realizamos ensayos TUNEL en cultivos fijados a 3, 4 y 7 dpt. Observamos que ninguna de las 611 neuronas transfectadas con TAg que fueron analizadas en estos puntos temporales mostraron marcaje positivo para la tinción TUNEL (**Fig. 23 B**).

Todos estos resultados sugieren que la causa de la muerte de estas neuronas no se debe a un mecanismo apoptótico. Habría que explorar las vías de activación de apoptosis independientes de p53 (Cipriani et al., 2001, Gilliams-Francis et al., 2003, Niikura et al.,

2007, McNamee and Brodsky, 2009, Shin et al., 2015) para aseverar que la apoptosis no juega ningún papel en la muerte celular observada.

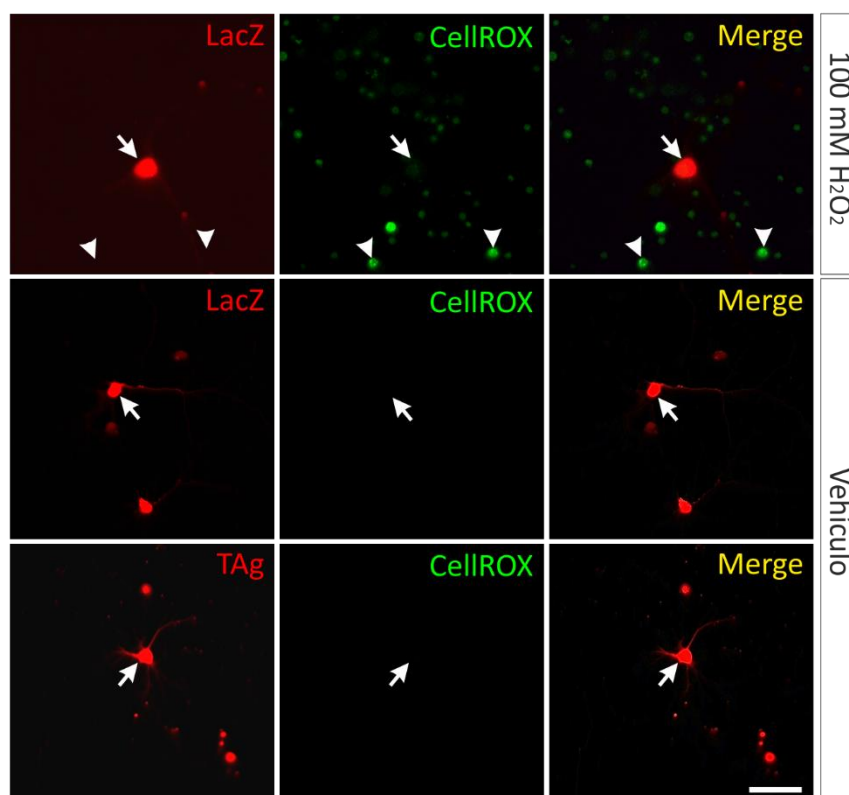


**Figura 23. La reentrada en ciclo de neuronas no desencadena muerte de tipo apoptótica clásica.** (A) Inmunocitoquímica del marcador anti caspasa 3 activa (verde) a 7 dpt en neuronas corticales (NeuN, blanco) transfectadas con RFP/TA. (B) Marcaje de TUNEL (verde) a 3 dpt en neuronas corticales (NeuN, blanco) transfectadas con RFP/TA. Las neuronas transfectadas sin marcaje de TUNEL se indican con la flecha, mientras que las células no transfectadas que son TUNEL positivas se marcan con la punta de flecha. El ADN de las neuronas está marcado con DAPI (azul). Escala = 40µm.

Numerosos estudios han asociado el estrés oxidativo como componente esencial en los procesos de neurodegeneración (Tonnie and Trushina, 2016, Scheff et al., 2016). Con el fin de evaluar si el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la muerte asociada a la reactivación de ciclo en neuronas, realizamos ensayos con una sonda fluorogénica, CellROX Green, encargada de marcar especies reactivas ROS, en cultivos mantenidos durante 4 días después de haber sido transfectados con TAg. Este compuesto se oxida por una serie de especies reactivas del oxígeno, como radicales hidroxilo y aniones superóxido, transformándose en un compuesto capaz de emitir fluorescencia. Por tanto, a mayores niveles de ROS mayor será la intensidad de fluorescencia.

A nivel basal, no encontramos marcaje fluorescente de la sonda CellROX en ninguna de las neuronas, ni en las transfectadas con TAg ni en las control LacZ (n= 168 células). En cambio cuando se estimulan con peróxido de hidrógeno se observa un aumento significativo de la producción de ROS en aquellas neuronas no transfectadas de los cultivos, lo cual se utilizó como control positivo del experimento (Fig. 24).

Estos resultados sugieren que el tipo de muerte celular asociado a la expresión de TAg, y por tanto a la reentrada en ciclo neuronal, es independiente de estrés oxidativo.

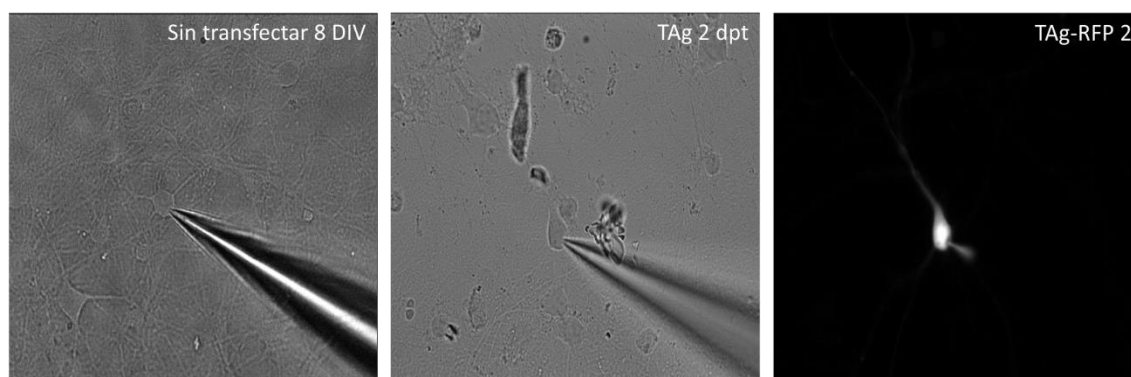


**Figura 24. La reentrada en ciclo de neuronas no provoca estrés oxidativo.** Imágenes representativas que muestran marcaje positivo de la sonda CellROX (verde) detectado en las células corticales a las que se les ha tratado con 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  tras 60 minutos (puntas de flecha) como control

positivo. Por otro lado, no se observó marcaje en las mismas condiciones de transfección con LacZ o TAg a 3 dpt (flechas). Escala = 40µm.

## La reentrada en ciclo en neuronas corticales desemboca en disfunción sináptica

Numerosos estudios han demostrado un descenso significativo en la densidad sináptica en corteza e hipocampo de cerebros de AD, existiendo una fuerte correlación entre la densidad sináptica y el grado de demencia (DeKosky and Scheff, 1990, Bertoni-Freddari et al., 1996). Por lo tanto, uno de las características principales de la enfermedad de Alzheimer es la aparición de déficits a nivel sináptico ya en las primeras etapas de la enfermedad. Con el objetivo de relacionar este fenómeno con la reactivación de ciclo forzosa en neuronas se llevaron a cabo registros electrofisiológicos en neuronas transfectadas con TAg versus neuronas control (**Fig. 25**).



**Figura 25. Imágenes en campo claro (izquierda y centro) y fluorescencia (derecha) de ejemplos de neuronas empleadas para el registro en distintas condiciones.**

Existen una serie de propiedades activas y pasivas que nos proporcionan información sobre la capacidad eléctrica neuronal. La neurona tiene una membrana bilipídica que contiene un gran número de canales transportadores de iones cuya apertura o cierre puede ser dependiente de voltaje, independiente de voltaje (es decir, su dinámica de apertura y cierre no está modulada por el valor del potencial de membrana), y/o dependientes de la unión de ligandos o estímulos físicos (Berg et al., 2003). La membrana actúa como un capacitor que almacena un valor de carga eléctrica proporcional al potencial o voltaje que experimenta (Barbour, 2014). Sin embargo, la membrana plasmática de las neuronas no es un puro capacitor debido a las proteínas (canales) transmembrana capaces de transportar los iones cargados de un lado a otro. Esta propiedad atribuye una resistencia (cuya inversa es la conductancia) en paralelo con la capacitancia de la membrana celular (Barbour, 2014). Los valores de resistencia de membrana ( $R_m$ ) de las neuronas

transfectadas se calcularon teniendo en cuenta la relación entre la intensidad del pulso de corriente ( $I$ ) y la diferencia de voltaje ( $\Delta V$ ) que induce, siguiendo la ley de Ohm ( $R_m = \Delta V / I$ ).

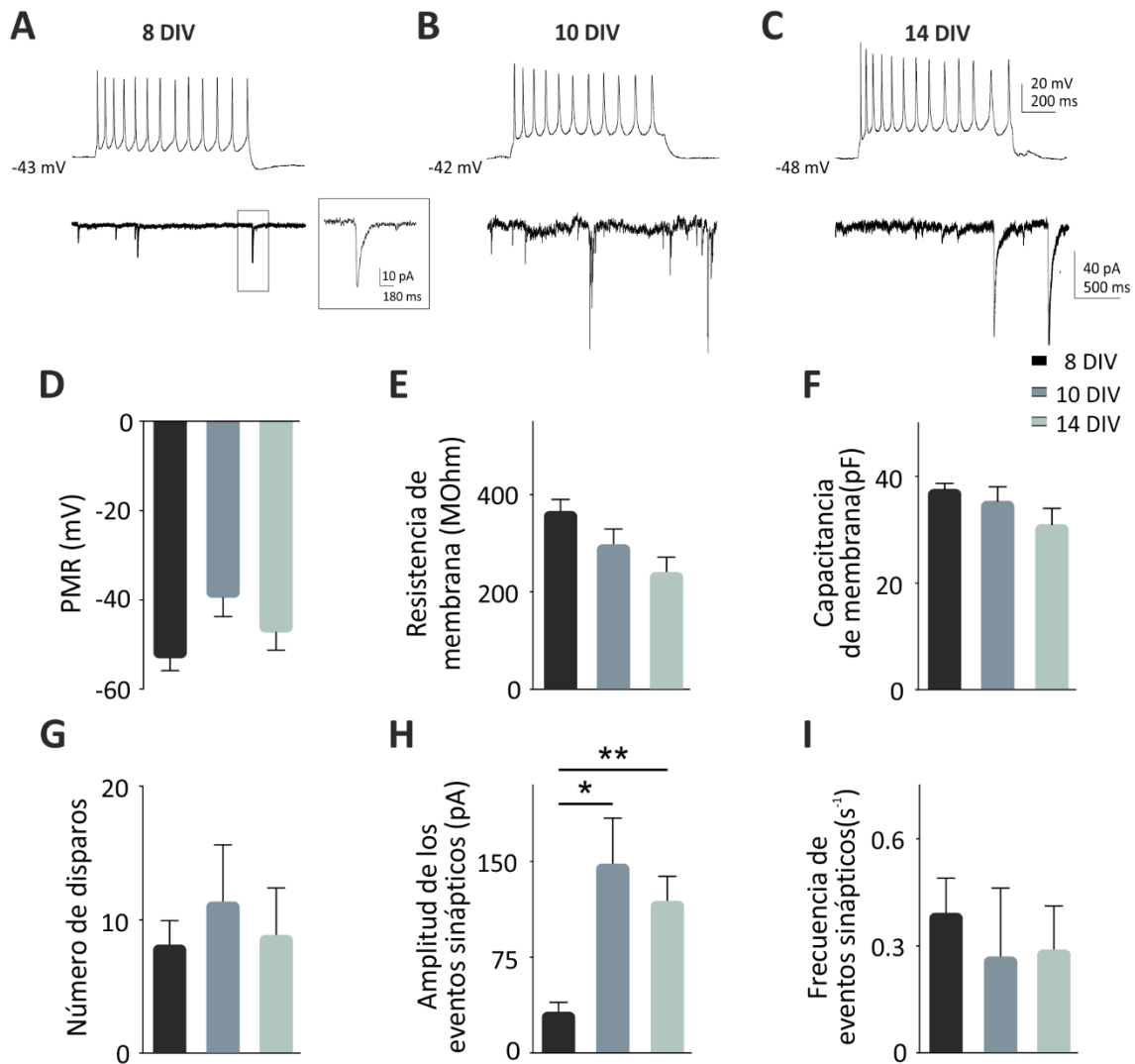
Como se ha comentado anteriormente, la membrana tiene propiedades capacitivas además de resistivas, por lo que un pulso de corriente que atravesase la membrana no va a ser capaz de provocar un cambio de potencial instantáneo, si no que va a existir un retraso en el tiempo hasta que se alcance el voltaje máximo. Para el análisis paramétrico de dicho retraso se emplea la constante de tiempo de membrana ( $\tau$ ), que corresponde al tiempo necesario para que el cambio de potencial de membrana sea el 63 % de su valor máximo estable. En segundo lugar determinamos la capacidad de membrana ( $C_m$ ), que a menudo corresponde con el tamaño de la célula siguiendo la relación ( $C_m = \tau / R_m$ ).

En cuanto a las propiedades activas, analizamos la capacidad de descargar potenciales de acción (PAs). Para ello se realizaron experimentos en fijación de corriente (*current clamp*), con pulsos despolarizantes hasta alcanzar el umbral de potencial de membrana en el que las células comenzaban a disparar. El cambio en el patrón de frecuencia, la duración del tren de disparo o el número de PAs de las neuronas pueden suponer un cambio cualitativo en la información que se está procesando (Magee and Carruth, 1999, Harris et al., 2001, Kepecs et al., 2002). Es decir, una neurona es capaz de regular la información que transmite mediante su frecuencia de disparo (Brumberg et al., 2000). Por ello, el objetivo de este análisis se centra en encontrar si existen o no diferencias en la capacidad de transmisión de información sináptica de una neurona que ha reactivado el ciclo celular.

Para el análisis de las propiedades postsinápticas de las neuronas analizadas se realizaron registros con fijación de voltaje (*voltage clamp*) de la membrana, que obtiene información sobre las corrientes de origen postsináptico que recibe la neurona registrada. Estos eventos espontáneos obtenidos corresponden con los potenciales excitatorios e inhibitorios postsinápticos (PSCs), que a su vez corresponden con la apertura y cierre de los canales iónicos dependientes de ligando (sodio, potasio, calcio, cloro...). La suma de todos estos eventos individuales es responsable de las fluctuaciones del voltaje de la membrana celular que finalmente podría alcanzar el potencial de membrana umbral para el disparo de potenciales de acción. Los dos parámetros analizados de estos eventos postsinápticos espontáneos son la amplitud y la frecuencia. El primer parámetro suele proporcionar información general sobre la capacidad de recepción postsináptica de los *inputs*, es decir, la cantidad de canales funcionales AMPA, NMDA, etc. En cuanto a la frecuencia, éste es un parámetro que suele asociarse con el componente presináptico de los eventos.

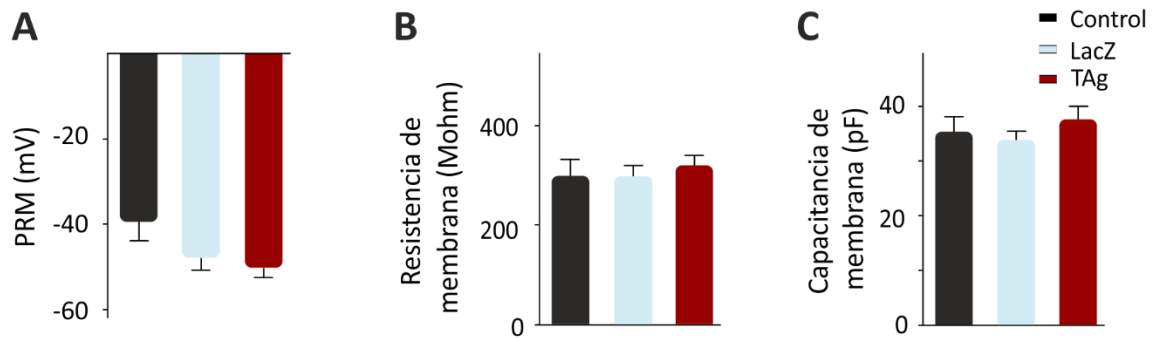
En primer lugar, para definir bien la maduración sináptica de nuestros cultivos se caracterizaron las propiedades electrofisiológicas básicas de la membrana en neuronas con 8 (el equivalente al día de la transfección), 10 (correspondería con 2 dpt) y 14 DIV (correspondería con 6 dpt). Se realizaron para ello los registros en *current clamp* y se analizaron las propiedades pasivas: potencial de membrana en reposo (PMR), resistencia de membrana y capacitancia de la membrana.

Se observó que las neuronas a esos tiempos son capaces de disparar potenciales de acción sin diferencias en el número de disparos descargados ni diferencias en las propiedades pasivas (PMR, Rm o Cm). Sin embargo, mientras que la frecuencia de los eventos espontáneos no cambian en el cultivo con el tiempo, sí que experimentan un incremento de amplitud (**Fig. 26 H**). Estos resultados indican un aumento en la maduración de los contactos sinápticos en las neuronas corticales en cultivo a medida que pasan los días *in vitro* (**Fig. 26**). Estos experimentos en cultivos de neuronas corticales sin transfectar demostraron que las neuronas analizadas en este estudio son maduras desde el punto de vista electrofisiológico y que las diferencias encontradas se deben a las distintas condiciones experimentales.



**Figura 26. Perfil electrofisiológico de neuronas corticales *in vitro*.** (A-C) Los trazos superiores representan el perfil de disparo de las neuronas crecidas durante 8 (día de la transfección), 10 y 14 DIV (la corriente inyectada fue de 100 pA, 1 s). Los trazados inferiores muestran la actividad sináptica espontánea de estas células. El cuadro en A es una magnificación del trazado inferior. (D-I) Cuantificaciones de los distintos parámetros electrofisiológicos indicados. La amplitud de los eventos sinápticos espontáneos muestra un aumento significativo con el tiempo, mientras que el resto de los parámetros se mantienen estables. Las barras de error muestran SEM.

A continuación, se realizaron registros en cultivos de neuronas corticales cotransfectadas a 8 DIV con RFP junto con LacZ o TAg. Los resultados de estos registros se muestran en la **Fig. 27**, donde se observa que las neuronas transfectadas a los 2 dpt (cuando la incorporación de BrdU ha alcanzado su máximo sin observarse muerte celular) mantienen los parámetros de PMR, Rm y Cm inalterados en todas las condiciones analizadas. Estos datos nos indican que ni el proceso de transfección ni la reentrada en ciclo por parte de TAg afectan a la integridad de la membrana en estas neuronas.

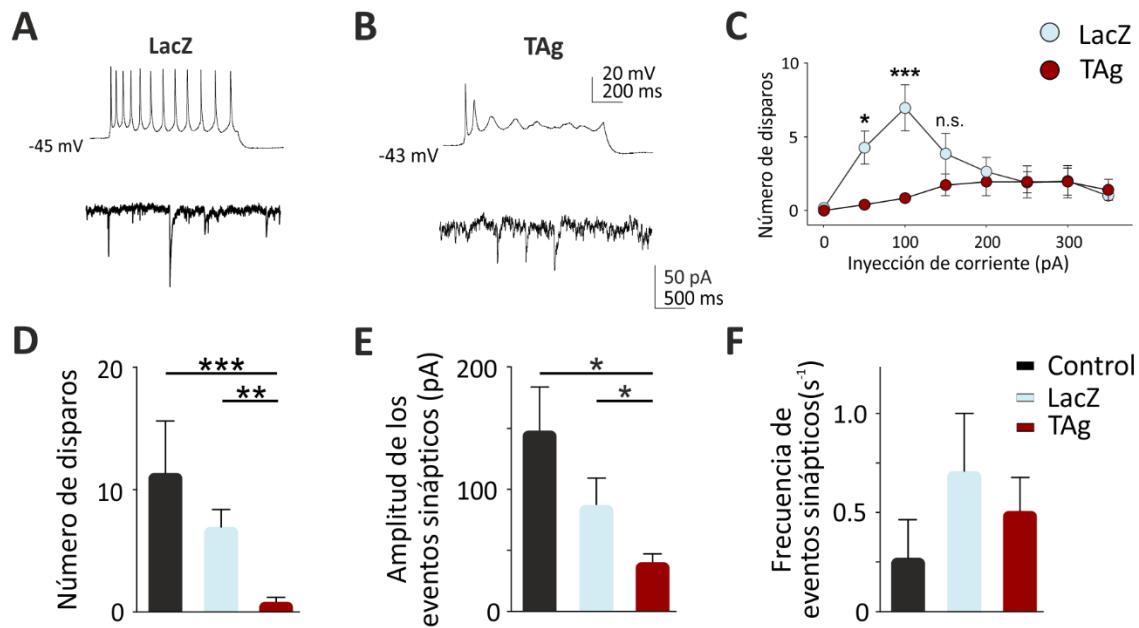


**Figura 27. Las propiedades intrínsecas de las neuronas transfectadas con el plásmido control y con TAg se mantienen 2 dpt.** Los valores del potencial de membrana en reposo (PMR), la resistencia y la capacitancia de la membrana son similares en todas las condiciones (neuronas sin transfectar, neuronas transfectadas con LacZ y las transfectadas con TAg).

Posteriormente, evaluamos la excitabilidad intrínseca en registros en modo *current clamp* mediante inyecciones de corriente despolarizantes, evocando descargas de potenciales de acción (**Fig. 28 C**).

En estas condiciones experimentales, determinamos que la capacidad de disparo de las neuronas transfectadas con TAg se ve reducida significativamente a los 2 dpt. En contraste, las neuronas sin transfectar y las transfectadas con el plásmido LacZ sí son capaces de inducir trenes de potenciales de acción (PAs) (**Fig. 28 D**). Asimismo, también medimos la actividad espontánea en modo *voltage clamp* en todas las neuronas transfectadas (ver los trazos inferiores de las **Fig 28 A y B**). Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en la frecuencia de los eventos entre las diferentes condiciones (**Fig 28 F**). Sin embargo, la amplitud de estos eventos presenta una disminución significativa en las neuronas TAg a las que se les ha forzado la reentrada en ciclo, en comparación con las neuronas sin transfectar o las transfectadas con el control (**Fig. 28 E**).





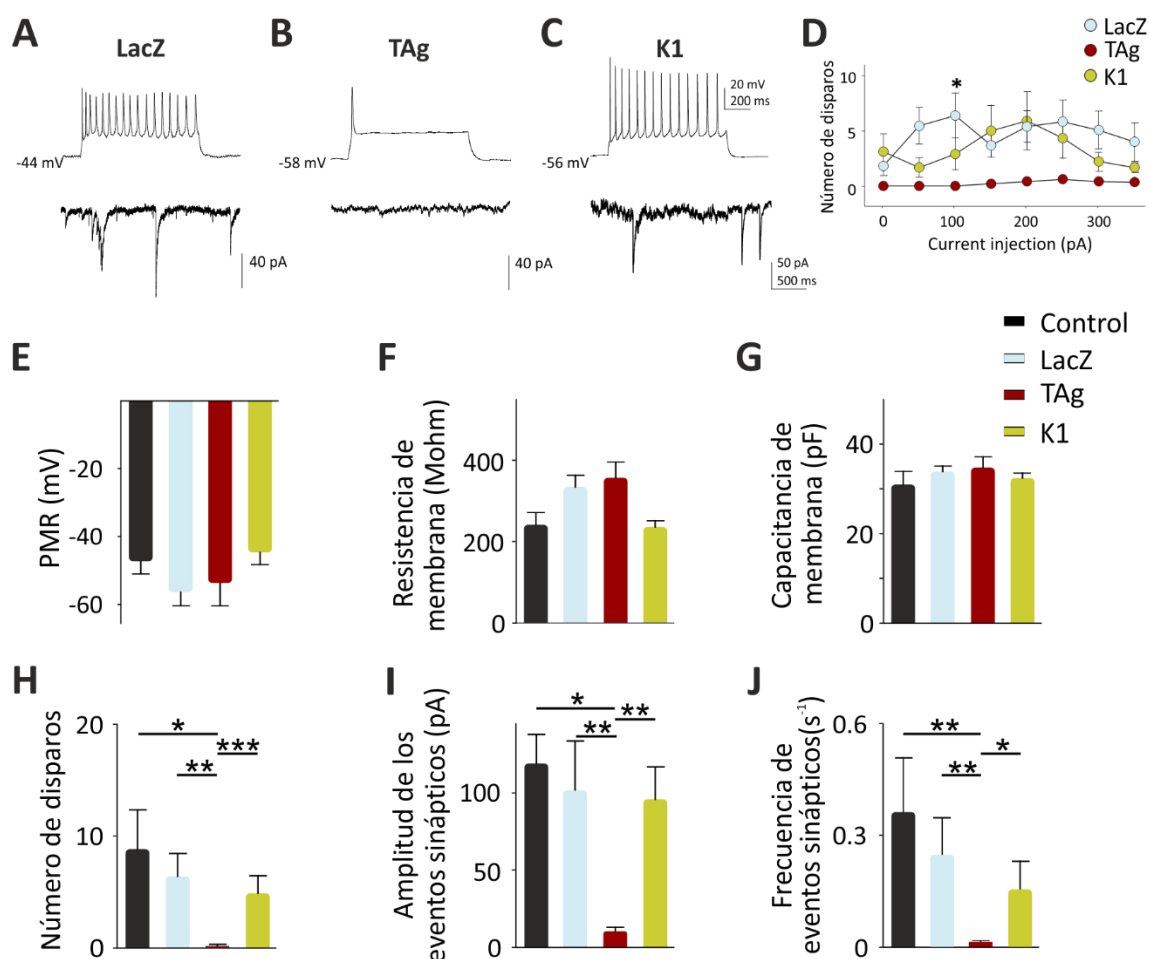
**Figura 28. Perfil electrofisiológico de neuronas corticales *in vitro* a 2 dpt.** (A-B) Los trazados superiores representan el perfil de disparo de las neuronas transfectadas con el plásmido control LacZ o con TAg a 2 dpt (la corriente inyectada fue de 100 pA, 1 s). Los trazados inferiores muestran la actividad sináptica espontánea de estas células. (C) Curvas de *input-output* a 2 dpt de las neuronas en las condiciones indicadas. (D-F) Cuantificaciones de los distintos parámetros electrofisiológicos indicados en las neuronas no transfectadas (control), neuronas transfectadas con RFP y con LacZ o con TAg. Las neuronas que han reactivado el ciclo presentan una disminución significativa frente a los controles en el número de potenciales de acción disparados y la amplitud de los eventos sinápticos espontáneos. No presentan diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de estos últimos a 2 dpt. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Las barras de error muestran SEM.

Las propiedades electrofisiológicas medidas a los 6 dpt, momento anterior a la reducción total de la supervivencia en las neuronas transfectadas con TAg, indican que se produce una degeneración sináptica en estas neuronas. En concreto, encontramos diferencias significativas en la excitabilidad intrínseca similares a las observadas a los 2 dpt (**Fig. 29 D**). Estos resultados indican la existencia de una pérdida drástica del número de potenciales de acción capaces de ser descargados en las neuronas que han reentrado en ciclo por TAg (**Fig. 29 H**). Este deterioro se aprecia en el perfil de potenciales de acción (**Fig. 29 A y B** trazo superior). En concreto, se observa que las neuronas transfectadas con LacZ son capaces de disparar trenes de potenciales de acción, mientras que las que han reentrado en ciclo sólo disparan un potencial de acción o ninguno. Este efecto es independiente del proceso de transfección, ya que las neuronas control sin transfectar tienen el mismo perfil que las LacZ (**Fig. 26 C**, trazo superior). A los 6 dpt, al igual que a 2 dpt, la amplitud de los eventos espontáneos, evaluada mediante *voltage clamp*, está significativamente disminuida en las neuronas transfectadas con TAg en comparación con los controles. Además, la frecuencia está también afectada (**Fig. 29 I y J**). Los cambios en las propiedades intrínsecas a los 6 dpt, son también independiente del proceso de transfección o la reentrada en ciclo

dependiente de TAg (**Fig. 29 E-G**), lo cual permite la comparación correcta del resto de los parámetros

Todos estos resultados indican que la reentrada en ciclo en neuronas diferenciadas compromete y altera la excitabilidad y las propiedades sinápticas de éstas.

Con objeto de confirmar las alteraciones observadas en las neuronas transfectadas con TAg, se registraron en las mismas condiciones neuronas corticales transfectadas con el plásmido K1. Estas neuronas no mostraron diferencias en las características eléctricas ni en las respuestas sinápticas que se analizaron, mostrando un comportamiento similar a las neuronas sin transfectar o a las transfectadas con el plásmido control LacZ (**Fig. 29 C, E-G**). Como se observa en las gráficas, (**Fig. 29 H-J**) las neuronas transfectadas con K1 muestran una mejora significativa tanto en el número de PAs, como en la amplitud y frecuencia de las respuestas sinápticas en comparación con las neuronas TAg.



**Figura 29. Perfil electrofisiológico de neuronas corticales *in vitro* a 6 dpt.** (A-C) Los trazados superiores representan el perfil de disparo de las neuronas transfectadas con el plásmido control LacZ, con TAg, o con K1 (mutante de TAg) a 6 dpt (la corriente inyectada fue de 100 pA, 1 s). Los trazados inferiores muestran la actividad sináptica espontánea de estas células. (D) Curvas de *input-output* a 6 dpt de las neuronas en las condiciones indicadas. Se puede observar la diferencia de

excitabilidad entre las neuronas TAg frente a las control LacZ. (E-J) Cuantificaciones de los distintos parámetros electrofisiológicos indicados en las neuronas no transfectadas (control), neuronas transfectadas con RFP y con LacZ, con TAg, o K1. Los parámetros correspondientes a las propiedades intrínsecas de las neuronas se mantienen similares en las cuatro condiciones. Se observa una disminución más acusada en las neuronas TAg a este tiempo en los parámetros de número de disparos descargados y la amplitud y frecuencia de los eventos espontáneos en comparación tanto con las neuronas no transfectadas (control) como con las transfectadas con el plásmido control LacZ y con las neuronas transfectadas con el mutante de TAg, K1, que presenta valores de todos estos parámetros similares a los dos anteriores. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Las barras de error muestran SEM.

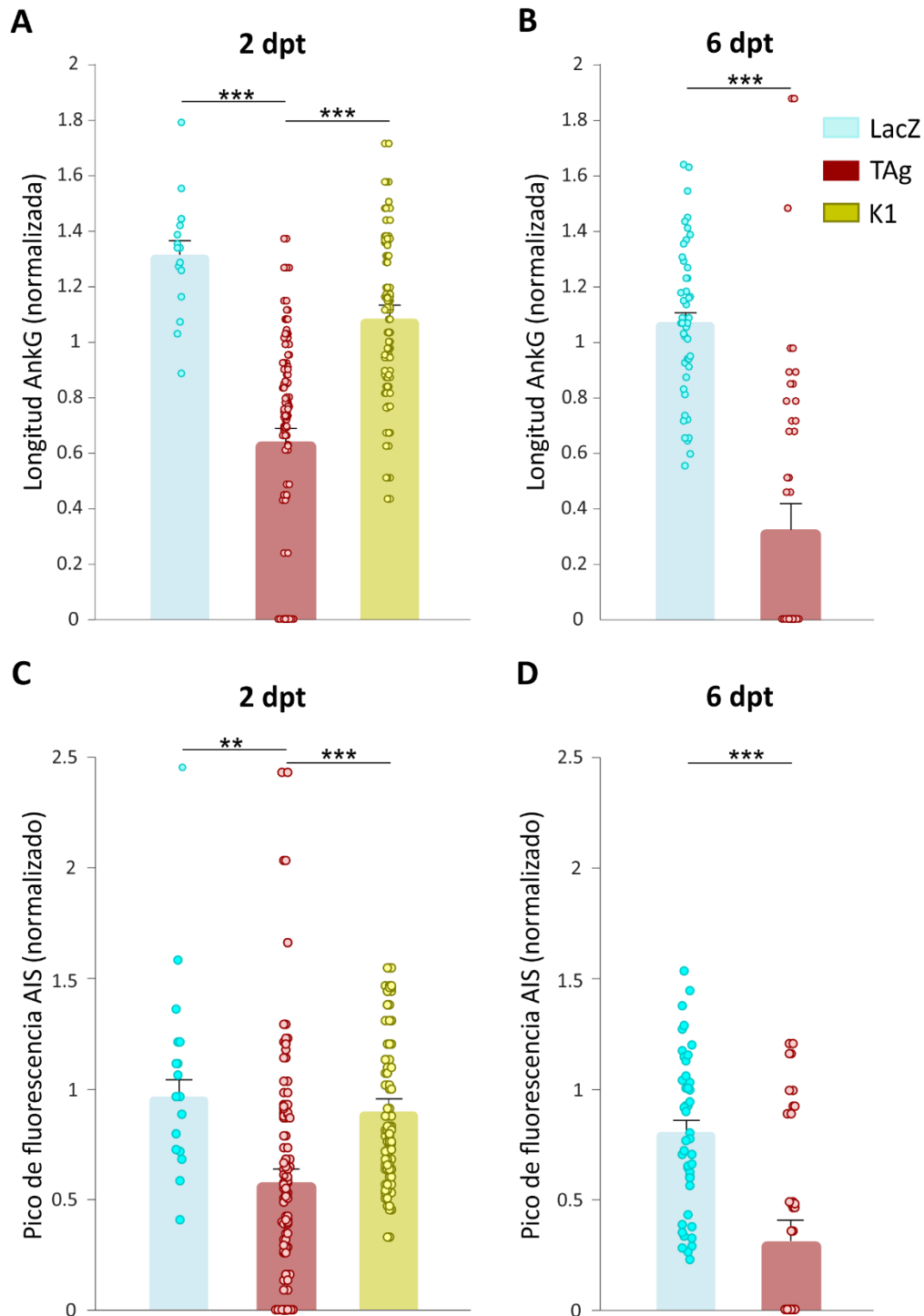
### **La reducción en la capacidad de disparo de las neuronas que reactivan ciclo correlaciona con una deficiencia a nivel de AIS**

Con el objetivo de explorar los mecanismos responsables de la reducción en la capacidad de disparo de potenciales de acción en las neuronas que han reactivado el ciclo se analizó el segmento inicial del axón (*axon initial segment*, AIS). Esta estructura es fundamental para la estabilidad de la neurona y es identificado comúnmente por una de sus proteínas estructurales, la ankirina G (Ank G). El AIS es el responsable de separar el transporte de moléculas del soma al axón, de integrar el input sináptico somatodendrítico así como de iniciar el potencial de acción (Jones and Svitkina, 2016). Previamente, se ha demostrado que la reducción en la longitud de esta estructura previene el disparo repetitivo y, por lo tanto, la actividad eléctrica (Evans et al., 2015). Para conocer si la reentrada en ciclo provoca diferencias en el AIS se realizó una inmunotinción de Ank G y se midió tanto la longitud como el pico de fluorescencia (VPF) (Grubb and Nature, 2010) en las neuronas transfectadas con LacZ, TAg y K1. Todos los valores de estos parámetros se normalizaron frente a aquellos de neuronas no transfectadas de los mismos campos microscópicos (Fig. 31).

El análisis indicó que a los 2 dpt tanto la longitud media como el valor máximo de fluorescencia del AIS están significativamente reducidos en las neuronas que expresan TAg (Fig. 30 A y C). Las neuronas transfectadas con el mutante no tienen afectado el AIS confirmándose de nuevo que este efecto sólo depende de la capacidad de TAg al inducir reentrada en ciclo (Fig. 30 A y C). Cabe destacar que, a este tiempo, encontramos una pequeña población de neuronas transfectadas con TAg que han reactivado la maquinaria de ciclo (~20 %) con una reducción del AIS más dramática que en el resto de las neuronas TAg positivas (Fig. 31 paneles A y B izquierda).

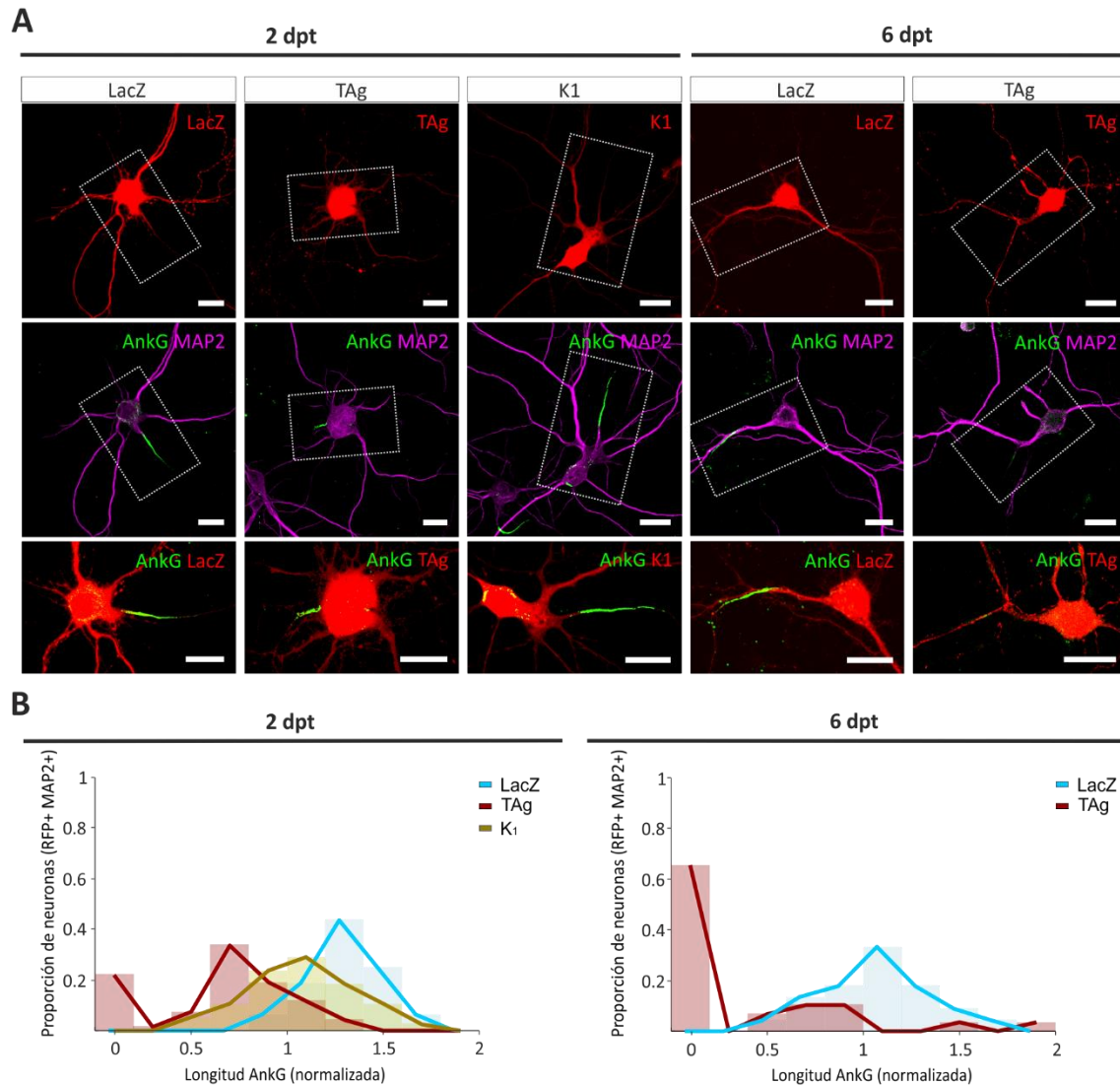
A los 6 dpt observamos que el AIS está ausente en alrededor de un 65 % de las neuronas que expresan TAg, mientras que el resto de estas neuronas presentan un valor de longitud de AIS reducido (Fig. 31, paneles A y B derecha). En conjunto, se observa una

disminución significativa de la longitud y de los valores de VPF (**Fig. 30 B y D**). Todo esto implica que la longitud del AIS se ve progresivamente reducida. Además, estos resultados sugieren que la reactivación de ciclo en las neuronas diferenciadas resulta en una reducción progresiva y pérdida final de la estructura del AIS, afectando a la capacidad de disparo y conectividad de estas neuronas (**Fig. 28 D y 29 H**).



**Figura 30. La reactivación de ciclo resulta en una disminución progresiva de la longitud y valor máximo del pico de fluorescencia del AIS en las neuronas corticales. (A y B) La longitud**

media del AIS de las neuronas transfectadas, normalizada respecto a la longitud AIS media de las neuronas no transfectadas de los mismos cultivos, a 2 dpt (A) y 6 dpt (B). Cada punto representa la longitud normalizada de los AIS de cada neurona transfectada. (C y D) El valor del pico de fluorescencia (VPF) medio de las neuronas transfectadas respecto con el valor normalizado del VPF de los AIS de las neuronas no transfectadas de los mismos cultivos, a los 2 dpt (C) y 6 dpt (D). Cada punto representa el VPF normalizado de los AIS de cada neurona transfectada. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Las barras de error indican la SEM.



**Figura 31. La reentrada en ciclo en neuronas corticales resulta en un acortamiento progresivo y desaparición del AIS.** (A) Imágenes representativas de la inmunotinción de AnkG (verde) en las neuronas corticales MAP2 positivas (magenta) en los tiempos indicados después de la transfección con LacZ, TAg o TAg-K1 (rojo). (B) Histogramas que muestran la proporción de las neuronas transfectadas con la longitud de AIS indicada y normalizada respecto a la media del valor de la longitud del AIS de las neuronas no transfectadas en los mismos cultivos a los 2 dpt y 6 dpt. Escala: 20  $\mu$ m.

## **La reducción de la actividad espontánea en neuronas que han reactivado el ciclo correlaciona con una reducción de densidad de PSD-95**

A continuación, con objeto de investigar el mecanismo molecular que controla la reducción de la actividad espontánea con la reentrada de ciclo celular en las neuronas corticales, se evaluó la densidad de PSD-95. PSD-95 es un complejo estructural postsináptico que sustenta múltiples proteínas necesarias para la formación sináptica y su función (Sheng and Kim, 2011). Al igual que en experimentos anteriores las neuronas corticales se transfectaron con plásmidos LacZ (control) y TAg junto con un plásmido reportero RFP. Se realizó un marcaje inmunocitoquímico y se procedió a analizar la presencia de agrupaciones del marcaje de PSD-95 en las dendritas de estas neuronas a los 6 dpt. En este tiempo, el número de agrupaciones de PSD-95 por área de dendrita en las neuronas transfectadas con TAg que permanecían vivas está significativamente reducido en comparación con las neuronas que expresan el plásmido control (**Fig. 32 A y B**). Con ello, podemos concluir que la disminución en las características de los eventos sinápticos espontáneos observados en las neuronas TAg que han reactivado el ciclo se puede deber a la reducción en la presencia de los componentes que constituyen el andamiaje de los botones sinápticos.

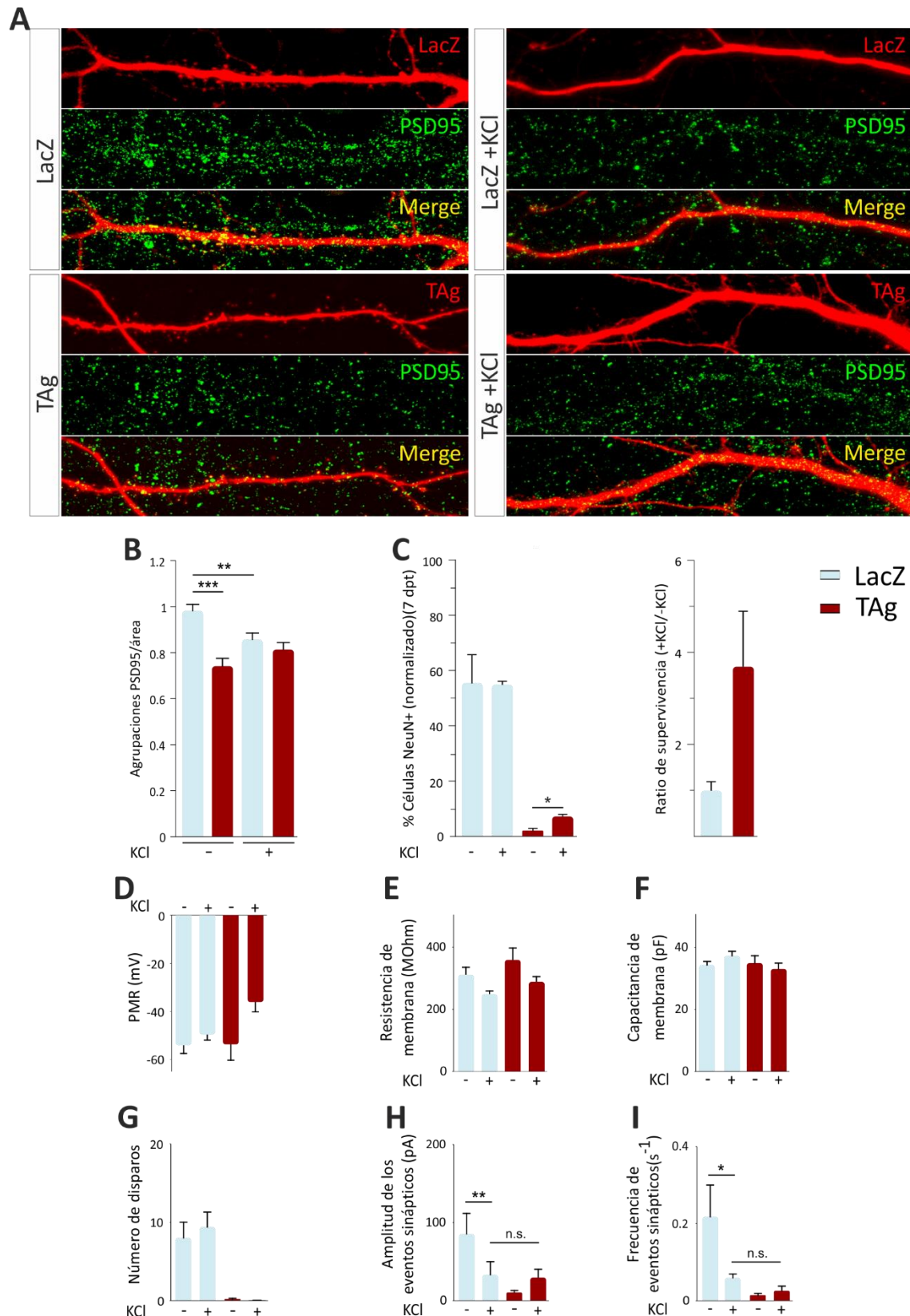
## **Las neuronas que expresan TAg tratadas con altos niveles de potasio extracelular mantienen los niveles de PSD-95, y muestran una recuperación parcial de supervivencia y de actividad sináptica espontánea**

Se ha observado con anterioridad cómo la presencia de un ambiente alto en potasio extracelular provoca una despolarización crónica de la membrana de las neuronas y favorece el aumento de la excitabilidad neuronal. Este efecto produce consecuentemente una regulación de la plasticidad sináptica así como una facilitación de la supervivencia neuronal (Ling et al., 1991, Edwards et al., 1991, Baker et al., 1992, Wang et al., 1994).

Para comprobar si estas condiciones podrían provocar en las neuronas transfectadas con TAg una mejora de las características sinápticas y funcionales, se añadió al medio KCl desde los 2 dpt hasta los 6 dpt usando una concentración de 15 mM (alto contenido en potasio extracelular). Encontramos que las neuronas control o transfectadas con LacZ presentan una reducción significativa de la densidad de PSD-95 con este tratamiento (**Fig. 32 A y B**), probablemente como mecanismo de adaptación homeostática de las neuronas para disminuir su actividad ante el incremento de excitabilidad (Dosemeci et al., 2001, Colledge et al., 2003). En condiciones de alto potasio extracelular se observó que la cantidad de agrupaciones de PSD-95 por área de dendrita en las neuronas que

expresan TAg no difiere de la densidad de las neuronas control (**Fig. 32 A y B**). El hecho de que en estas condiciones la densidad de este complejo estructural no decaiga como ocurre en las control indica que el efecto de una elevada excitabilidad sostenida previene la pérdida de PSD-95 provocada por la reentrada en ciclo.

Se realizaron registros electrofisiológicos en condiciones de alto potasio para verificar si la exposición crónica de alto potasio podría recuperar las propiedades eléctricas de las neuronas corticales que expresan TAg. En primer lugar, la exposición de alto potasio en cultivos corticales diferenciados no altera el potencial en reposo de membrana (PMR), la  $R_m$  o la  $C_m$  de las neuronas (**Fig. 32 D-F**). Sin embargo, encontramos que la amplitud de los eventos espontáneos en las neuronas corticales transfectadas con LacZ está reducida en estas condiciones (**Fig. 32 H**), observación consistente con la disminución de agrupaciones de PSD-95 tras este tratamiento (**Fig. 32 A y B**). Por otro lado, la amplitud de los eventos en el caso de las neuronas transfectadas con TAg mostró un aumento, aunque no significativo, llegando a alcanzar los mismos niveles que las transfectadas con LacZ en estas condiciones de alta excitabilidad (**Fig. 32 H**). Este tratamiento con alto potasio también indujo una reducción significativa de la frecuencia de estos eventos en las neuronas control LacZ (**Fig. 32 I**). Asimismo, al igual que la amplitud, este parámetro mostró un aumento moderado, aunque no significativo, en las neuronas que han reactivado ciclo, alcanzando también niveles similares a los observados en las células control (**Fig. 32 I**). Sin embargo, el número de disparos de potenciales de acción ante un estímulo despolarizante no mejoraba en las neuronas transfectadas con TAg en estas condiciones (**Fig. 32 G**). Este dato sugiere que un incremento en la excitabilidad del medio no es capaz de recuperar la habilidad reducida de las neuronas que expresan TAg para disparar trenes de potenciales de acción. Por lo tanto, estos resultados indican que una facilitación de la actividad eléctrica provoca el mantenimiento del PSD-95 así como una ligera mejora de la actividad espontánea sináptica en las neuronas que han reactivado ciclo. Además, en cuanto a la supervivencia se refiere, observamos una recuperación parcial de la muerte celular de las neuronas transfectadas con TAg al ser tratadas con alto potasio extracelular de 2 dpt a 6 dpt (**Fig. 32 C**). Todos estos datos, en conjunto, podrían indicar que existe una disfunción sináptica en las neuronas corticales como consecuencia de la reactivación el ciclo. Esta disfunción sináptica podría participar en el proceso de muerte retardada y progresiva que se observa en las neuronas de pacientes de AD.



**Figura 32. La despolarización crónica de la membrana mantiene la densidad de punta PSD-95 en las dendritas de las neuronas que han reactivado el ciclo, recupera la actividad sináptica espontánea y previene parcialmente la muerte neuronal.** (A) Proyecciones de confocal representativas mostrando el marcaje de PSD-95 (verde) en las dendritas (rojo) en neuronas de 6 dpt con las diferentes condiciones experimentales indicadas. (B) El número de punta específica de



PSD-95 a 6 dpt, normalizado con la situación control, en neuronas corticales co-transfectadas con RFP y LacZ o TAg. Los cultivos fueron tratados con 15 mM de KCl, como factor despolarizante de la membrana, (o con un vehículo) desde 2 dpt a 6 dpt. (C) Panel de la izquierda: el número de neuronas vivas co-transfectado con RFP y LacZ o TAg en la presencia o ausencia de 15 mM de KCl, normalizado frente al número de las neuronas transfectadas a 2 dpt. Estas neuronas se fijaron a 7 dpt. Panel de la derecha: ratio de supervivencia de las neuronas transfectadas con el control RFP-LacZ y aquellas transfectadas con RFP-TAg en presencia y ausencia de 15 mM de KCl. (D-I) Histogramas que muestran los diferentes parámetros electrofisiológicos monitorizados a 6 dpt en neuronas bajo las condiciones descritas anteriormente. Se observa cómo la amplitud de los eventos espontáneos no es significativa pero tiene una mejora en las neuronas transfectadas con TAg similar a los valores de las neuronas control en condiciones de alto potasio en el medio. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Las barras de error indican la SEM.

## Modelo red neuronal

Por último, en este trabajo empleamos un modelo de red neuronal para explorar el impacto generado por el deterioro sináptico observado en la reentrada en ciclo por parte de un grupo de neuronas sobre una población mayor.

El modelo se compone de 4000 neuronas, divididas en tres poblaciones: interneuronas (10 %), neuronas excitatorias (85 %) y líderes (5 %). Esta última subpoblación representa neuronas con mayor frecuencia de disparo, a modo de neuronas que formen parte de nodos relevantes del circuito. Para analizar el efecto de la presencia de neuronas hiperploides (en lo que respecta al modelo denominadas “silentes”) se simuló un silenciamiento en diferentes porcentajes (1 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 % y 80 %) de las distintas poblaciones neuronales, y se observó el impacto inducido en la red. El silenciamiento fue implementado como un potencial de membrana excesivamente hiperpolarizado (-80 mV), 30 mV alejado del potencial de umbral de disparo de PAs (fijado a -50 mV). Estas fracciones de silenciamiento se realizaron sobre la población total, la subpoblación de las neuronas excitatorias, las interneuronas y las neuronas líderes. En la condición control no se ejercía ningún silenciamiento. Se simularon 5 repeticiones de cada condición ( $n = 6$  porcentajes de silenciamiento sináptico (menos el control)  $\times 5$  condiciones  $\times 5$  repeticiones = 150 simulaciones).

Se empleó un modelo de tipo *integrate-and-fire*, donde en cada instante de simulación (dt: 1 ms) el potencial de membrana de las neuronas (**Fig. 33**) depende de dos factores: a) una función exponencial, gobernada por una constante de tiempo (tau de membrana), que empuja el voltaje de la membrana a su potencial de reposo; y b) la cantidad de excitación e inhibición sináptica recibida. A su vez, se estimó el potencial de campo local (LFP, del inglés *local field potential*) como el promedio de todas las corrientes transmembrana (**Fig. 33**).

En primer lugar, se analizó el efecto del silenciamiento en fracciones crecientes de las distintas poblaciones– silenciamiento exclusivamente en células excitatorias, líderes o la red completa– en la frecuencia de disparo de dichas poblaciones (en todo momento, excluyendo la contribución de las neuronas hiperploidas). No se presentan los resultados del silenciamiento sobre las interneuronas, que resulta en una red epiléptica (ver **Fig. 12** de materiales y métodos) cualitativamente diferente del resto de perturbaciones observadas.

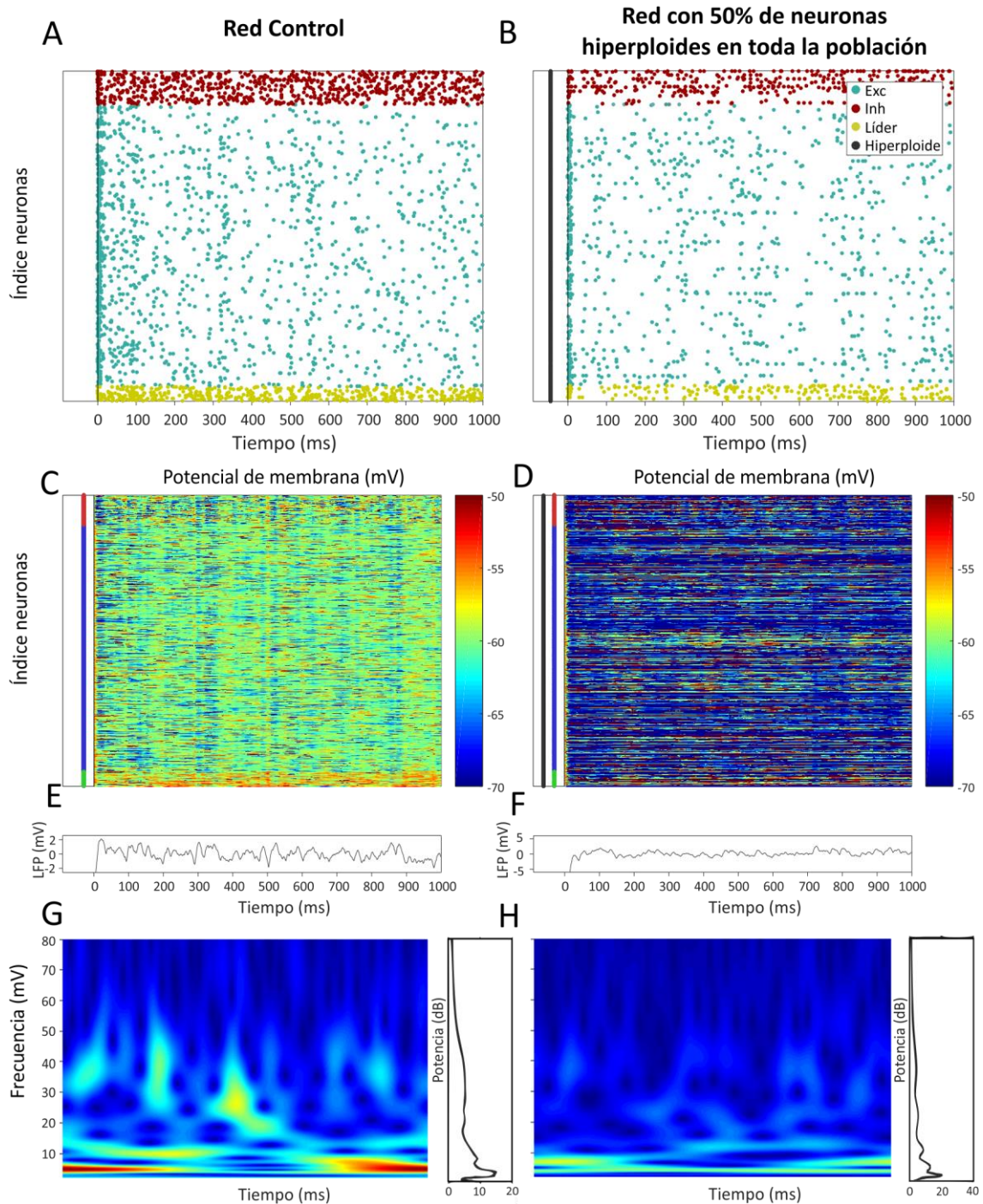
En términos generales, existe un efecto significativo tanto en el porcentaje de silenciamiento sináptico como en el tipo de subpoblación neuronal que se afecta sobre las demás poblaciones. Tomando como ejemplo representativo la subpoblación de neuronas excitatorias, a medida que aumenta la fracción de silenciamiento en las neuronas líderes y en las propias excitatorias, disminuye la frecuencia de disparo de esta subpoblación (**Fig. 34**). Por otro lado, un efecto interesante se presenta cuando se dañan fracciones al azar de la red total. A diferencia de las anteriores simulaciones, la interrupción en la capacidad de disparo sobre toda la red provoca un aumento en la frecuencia de disparo en la subpoblación de neuronas excitatorias (**Fig. 34**). Al verse afectadas fracciones aleatorias de todos los tipos neuronales, diferentes simulaciones muestran distintos desequilibrios entre excitación e inhibición. A porcentajes bajos de neuronas con silenciamiento, la frecuencia de disparo de la población no es distinta a la del control (sin daño) mientras que si la fracción va aumentando, en las diferentes repeticiones se obtienen resultados variables en función del tipo neuronal más afectado al azar. De manera complementaria, se calculó la correlación de Pearson entre la fracción de silenciamiento sináptico sobre los tres tipos de población analizados (toda la red, líderes y excitatorias) y la frecuencia de disparo en la subpoblación excitatoria. Los resultados mostraron que existe una correlación negativa significativa cuando se daña las subpoblaciones de neuronas líderes y excitatorias ( $R < 0$ ), es decir, a mayor porcentaje de neuronas con silenciamiento en estas subpoblaciones, menor es la frecuencia de disparo de las excitatorias (**Fig. 34**). Paralelamente, los resultados muestran una correlación positiva ( $R > 0$ ), cuando la población afectada es la total sobre la subpoblación excitatoria. Dicho de otra manera, una mayor fracción de neuronas silenciadas sobre la red global induce mayor frecuencia de disparo en las neuronas excitatorias (**Fig. 34**). Los mismos análisis se llevaron a cabo analizando el efecto sobre la población de interneuronas, líderes y sobre la población global (**Fig. 36 Anexo II**).

En resumen, la presencia de neuronas hiperploidas con déficits sinápticos (neuronas silentes) afecta a la frecuencia de disparo de la red neuronal en la que se encuentran integradas. Este efecto es además proporcional al porcentaje de neuronas

afectadas y provoca un incremento o disminución en función del tipo de población o subpoblación analizada.

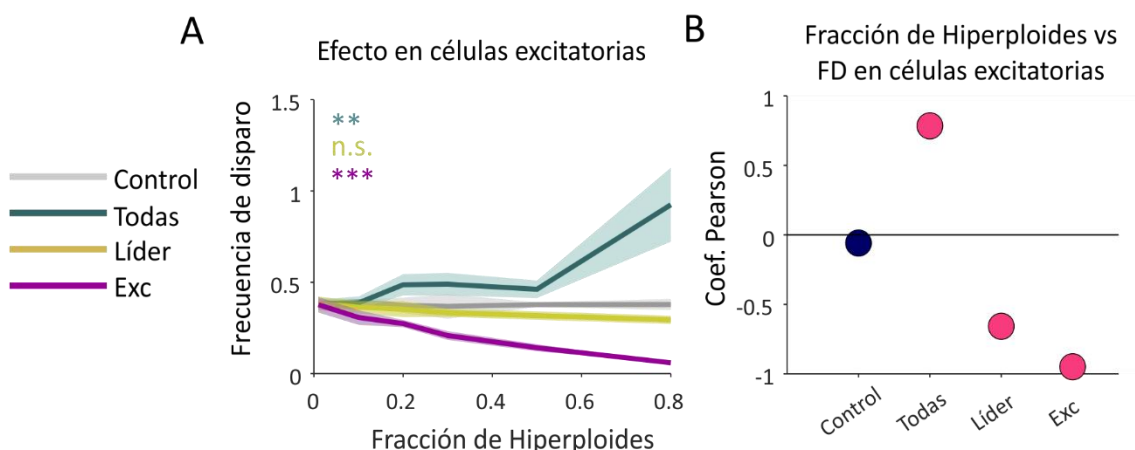
Por último, exploramos el efecto del silenciamiento en los patrones oscilatorios que genera espontáneamente la red. Las oscilaciones cerebrales, al igual que las observadas en nuestro modelo, son una propiedad emergente del sistema asociado a la coordinación del circuito y la transmisión de información entre sus elementos. Cabe destacar que el modelo desarrollado presenta picos de actividad sináptica en las bandas espectrales *gamma*, *beta*, *theta* y *delta* (**Fig. 33 paneles G y H**). Observamos un efecto significativo del silenciamiento sináptico sobre la actividad *gamma*, siendo éste dependiente tanto de la proporción de neuronas hiperploides (silentes) como de la población en la que éstas se encuentran (**Fig. 35**). Estos efectos se aprecian principalmente como una correlación negativa entre la fracción total y de neuronas excitatorias y la potencia de *gamma* (medida de la contribución de la banda al espectro de frecuencias). Efecto no significativo, por otro lado, cuando se dañan las líderes. En el resto de las bandas espectrales observamos cambios menores o no significativos (**Fig. 37 del Anexo II**).

En otras palabras, la presencia de neuronas hiperploides incapaces de transmitir la información sináptica tiene efectos directos en la frecuencia de disparo del resto de las neuronas no afectadas. Sin embargo, hay un impacto variable y menor en las oscilaciones. En definitiva, el conjunto de este análisis sugiere que la existencia de una suerte de “reserva cognitiva” expresada por parte de la red.

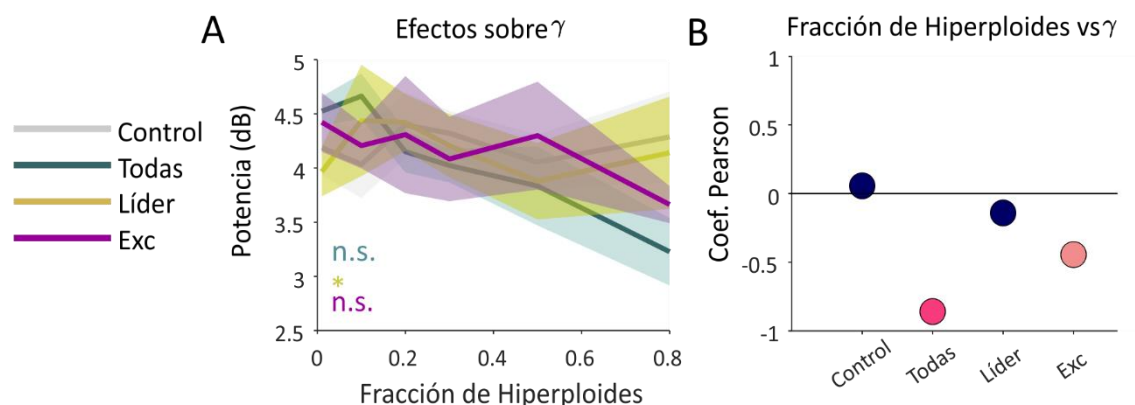


**Figura 33. Ejemplos de representaciones de los patrones de disparo y los potenciales de membrana de todas las neuronas a lo largo de la simulación (1 segundo), junto con los perfiles de los potenciales locales de campo y los espectros de las oscilaciones generados a partir de estas redes.** Se muestra un ejemplo representativo de la red control (sin presencia de neuronas hiperploides) en comparación con una red con neuronas hiperploides distribuidas por toda la red al azar (50 % de neuronas silentes). (A y B) Cada punto indica un PAs emitido por cada neurona (subpoblación de interneuronas en rojo, excitatorias en azul y líderes en amarillo). La disminución en el número de disparos es notable en la red afectada en comparación con la red control. (C y D) Matrices de potenciales de membrana de todas las neuronas de la red (los tonos azules hacen referencia a potenciales de membrana hiperpolarizados y los tonos rojos significan valores de despolarización). (E y F) Perfiles de potenciales locales de campo (mV). (G y H) Espectros de las

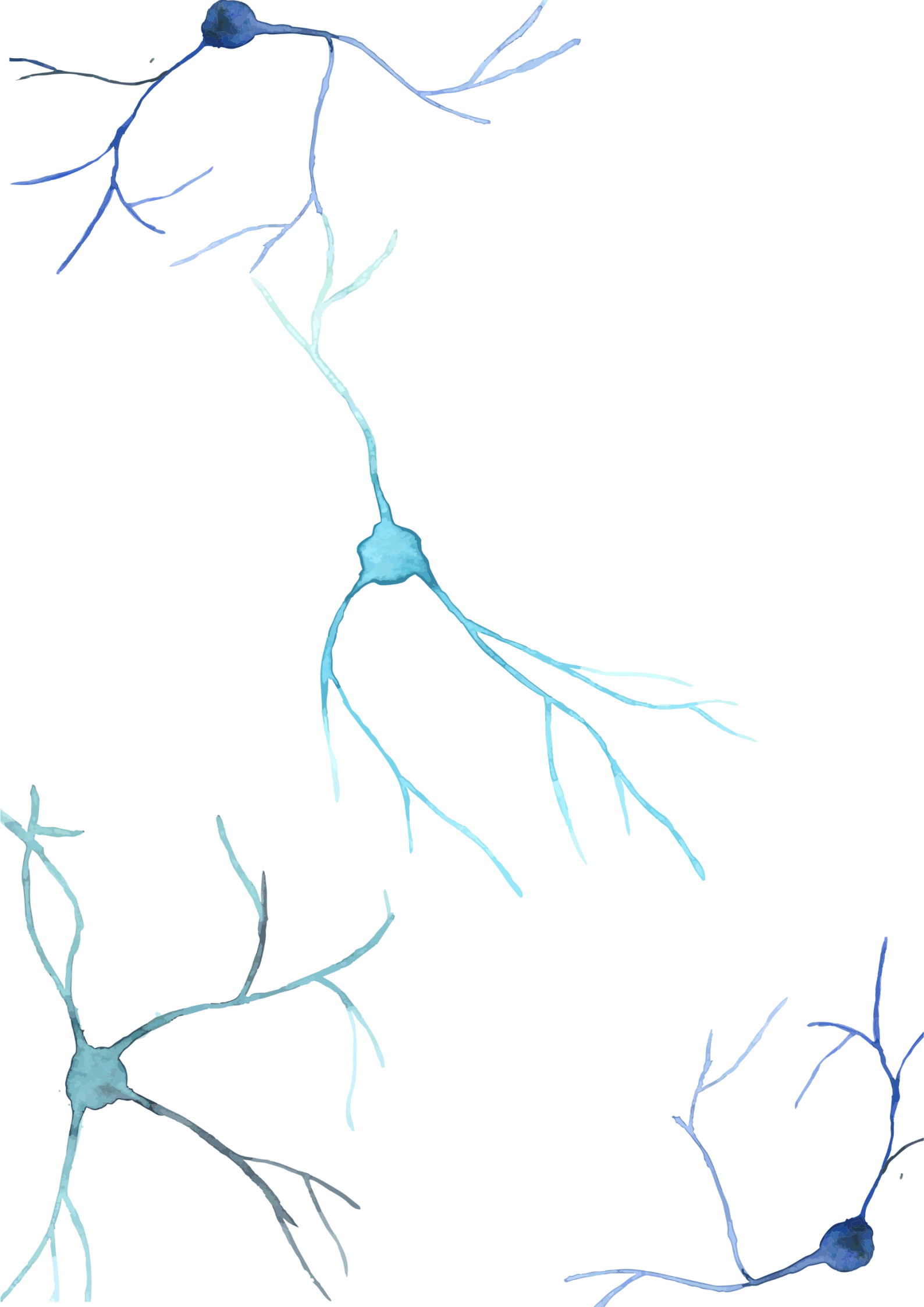
oscilaciones generadas a partir de cada red así como el perfil de potencia. Se indican las bandas de gamma (frecuencia entre 30-80 Hz), beta (12-30 Hz) y theta (4-8 Hz) y delta (0,1-4 Hz).

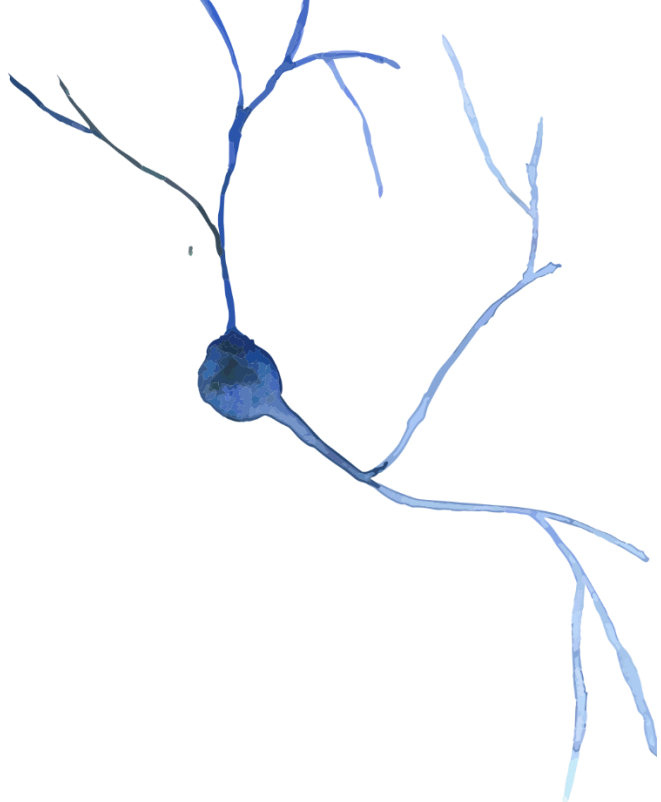
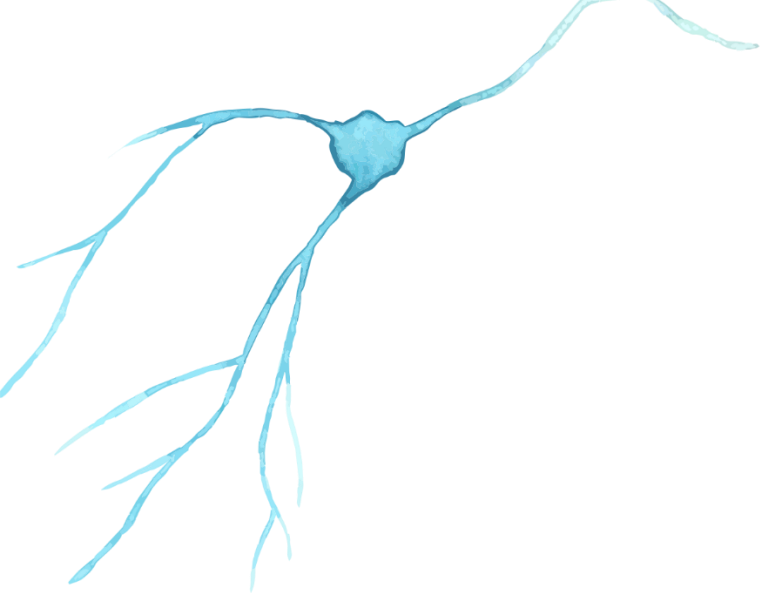


**Figura 34. Efecto de la presencia de neuronas hiperploides sobre la frecuencia de disparo (FD) de la subpoblación de neuronas excitatorias.** La gráfica muestran cómo se ve afectada la frecuencia de disparo de la subpoblación de neuronas excitatorias cuando (A) se va aumentando el porcentaje de neuronas hiperploides (silentes) en todas las neuronas (verde), en las líder (amarillo) o en las excitatorias (morado). Cada línea muestra la frecuencia media de disparo de cada población cuando se han afectado el tipo de neuronas correspondiente. La línea gris muestra la frecuencia media de la población cuando no hay silenciamiento de neuronas. En sombreado se muestran los intervalos de confianza del 95 % para cada línea. (B) Correlaciones de Pearson. Cada punto representa el valor exacto de la correlación de Pearson. En código de color se muestra el valor (en escala logarítmica)  $p$  de la correlación, magenta para  $p < 0.05$ , blanco para  $0.05$  y azul para  $p > 0.05$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

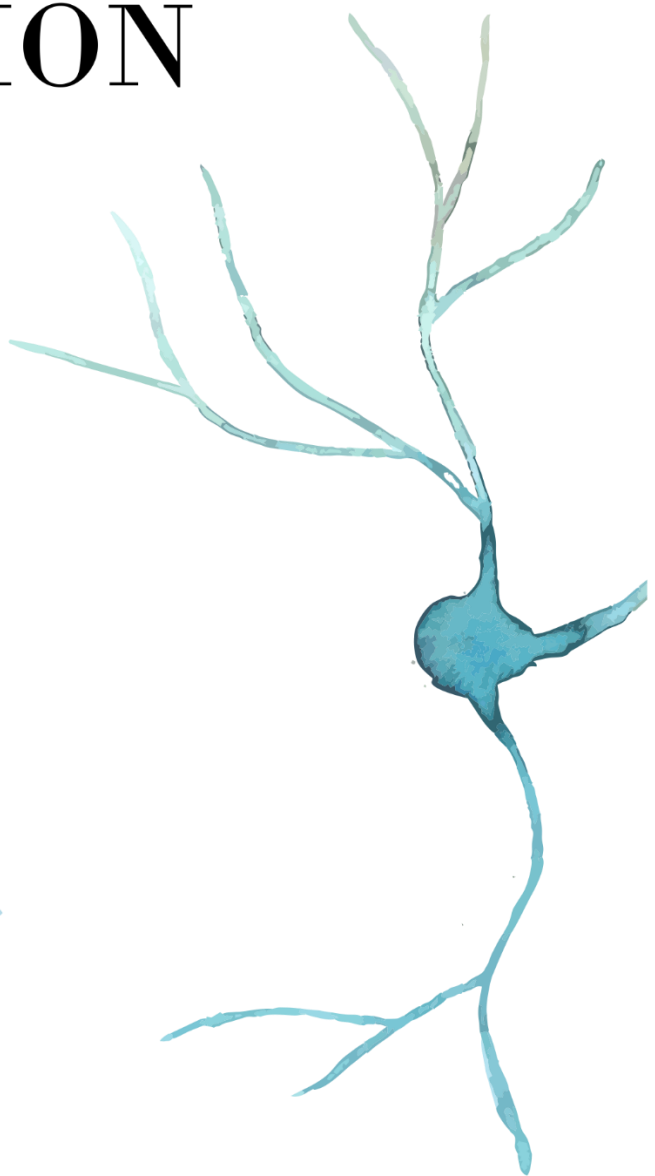
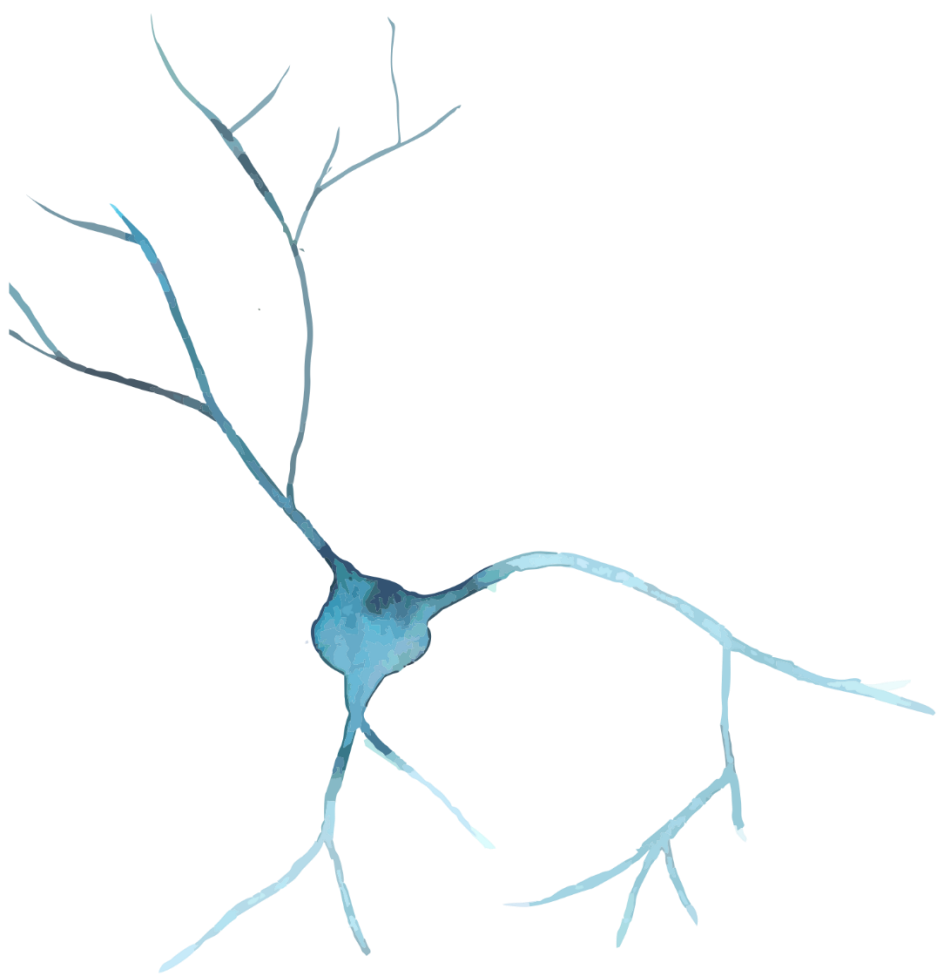


**Figura 35. Efecto de la presencia de neuronas hiperploides sobre la subpoblación de neuronas excitatorias en las oscilaciones de tipo gamma.** Las gráficas muestran cómo se ve afectada la actividad de gamma (A) cuando se va aumentando el porcentaje de neuronas hiperploides (silentes) en todas las neuronas (verde), en las líder (amarillo) o en las excitatorias (morado). La línea gris muestra la potencia (dB) media de esta oscilación de la población cuando no hay silenciamiento de neuronas. (B) Correlaciones de Pearson, tal y como en la figura 29 B. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .





# DISCUSIÓN



## Las neuronas diferenciadas son capaces de reentrar en ciclo celular *in vitro*

Los resultados de esta tesis doctoral muestran la capacidad de reactivar la maquinaria de ciclo celular *in vitro* en neuronas corticales murinas diferenciadas. Este proceso es inducido por la expresión del antígeno oncogénico T del virus SV40 en neuronas consideradas postmitóticas. La irreversibilidad del estado postmitótico neuronal comenzó a ponerse en duda cuando empezó a observarse que los cerebros *post mortem* de pacientes de Alzheimer muestran un aumento de marcadores de ciclo celular (Vincent et al., 1996, Nagy et al., 1997, McShea et al., 1997, Lu et al., 1999, Jordan-Sciutto et al., 2002, Nagy et al., 2002, Yang et al., 2003, Ogawa et al., 2003, Mosch et al., 2007, Thakur et al., 2008, Silva et al., 2014). Asimismo, se encontró en estos pacientes una población de neuronas con contenido en ADN superior al diploide, en una proporción significativamente superior a la de neuronas hiperploides generadas durante el desarrollo embrionario (Mosch et al., 2007, Zhu et al., 2008, Arendt et al., 2010b, López-Sánchez et al., 2017b). Cuando se observó que las neuronas hiperploides son más vulnerables a degenerar y morir, así como la presencia de estas neuronas en áreas cerebrales afectadas en estados tempranos de la enfermedad o conteniendo ovillos neurofibrilares (Vincent et al., 1996, McShea et al., 1997, Mosch et al., 2007, Arendt et al., 2010), se planteó la hipótesis acerca de una potencial reentrada en ciclo aberrante por parte de las neuronas “postmitóticas” como causa de la neurodegeneración.

Este fenómeno no parece ser exclusivo de AD ya que se ha descrito en otras enfermedades neurodegenerativas. Tanto en linfocitos inmortalizados de pacientes como en modelos de ratón y en cerebros *post mortem* de pacientes de Parkinson se ha observado la expresión de proteínas de ciclo incrementada (Smith et al., 2003, Höglinger et al., 2007, Esteras et al., 2015). También han sido identificadas actividades de ciclo aberrantes en esclerosis lateral amiotrófica (Ranganathan and Bowser, 2003), enfermedad de Huntington (Pelegri et al., 2008) o isquemia (Hayashi et al., 2000).

En nuestro modelo *in vitro* hemos podido comprobar, mediante la incorporación de BrdU, que las neuronas son capaces de traspasar el *checkpoint* G<sub>1</sub>/S y replicar su ADN (**Fig. 13**). Anteriormente se han descrito otros modelos *in vitro* e *in vivo* de reentrada en ciclo de neuronas maduras mediante inducción de daño en el ADN (Kruman, 2004, Schwartz et al., 2007), oncogenes c-myc (Lee et al., 2009) y ras (McShea et al., 2007), oligómeros de  $\beta$ -amiloide (Varvel et al., 2008, Bhaskar et al., 2009, Seward et al., 2013) o el propio antígeno TAg (Park et al., 2007). Sin embargo, la falta de marcadores específicos de neuronas maduras, la aparente incorporación de BrdU en neuronas en condiciones basales o el empleo de marcadores de ciclo no concluyentes, pone en relieve la necesidad de establecer un modelo riguroso de reentrada en ciclo en neuronas diferenciadas. En nuestro estudio,



evaluamos la identidad neuronal utilizando el marcador específico de neurona NeuN (Mullen et al., 1992) y corroboramos esta identidad a través de los registros electrofisiológicos. Asimismo, en nuestras manos, ninguna célula NeuN positiva incorpora BrdU en las condiciones control.

### **TAg como herramienta para la reentrada en ciclo en neuronas *in vitro***

La estrategia de emplear el antígeno TAg nos proporciona la posibilidad de forzar la entrada en ciclo de estas neuronas. Por un lado, se bloquea la proteína del retinoblastoma, que estaría secuestrando a los factores de transcripción E2F1-3, permitiendo la entrada a fase S tras la liberación de los mismos. Adicionalmente, TAg inhibe a p130/p107, liberando la interacción con los factores E2F4-5, bloqueando así el complejo DREAM, que es el encargado del mantenimiento del estado quiescente (fuera del ciclo celular) en la neurona (Sadasivam and DeCaprio, 2013). Y por otro, al estabilizar a la proteína p53 se evitaría la activación de cascadas de muerte programada, que se propiciarían ante este estímulo de entrada forzosa al ciclo.

Nuestro modelo mimetiza una situación similar a la encontrada en el cerebro de AD, en la que se ha observado pRb hiperfosforilado en diferentes aminoácidos (y por lo tanto favoreciendo el paso a fase S) y asociado con ovillos neurofibrilares, un fenotipo también presente en otras taupatías (Thakur et al., 2008, Stone et al., 2011). Tal fenómeno observado tanto en pacientes de AD como en el modelo de ratón transgénico 3xTg-AD sugiere que pRb hiperfosforilado precede a la patología de tau (Hradek et al., 2015). Por otro lado, se ha observado acumulación de p53 mutado tanto en ratones AD (Serrano et al., 2010) como en pacientes (Uberti et al., 2008). Estas formas mutadas, ya sea por mutaciones somáticas o por modificaciones postraduccionales, provocan cambios conformacionales que evitan la formación de los tetrámeros, necesarios para la función fisiológica normal de p53. De esta manera, cabe pensar que, al igual que ocurre en cáncer, la acumulación de mutaciones de p53 por el proceso de envejecimiento (Richardson, 2013) puede ser responsable del incremento de neuronas tetraploides asociado con la edad en el cerebro humano (López-Sánchez et al., 2017a).

Una crítica razonable, sin embargo, del uso del TAg es su relevancia a nivel fisiológico. A pesar de tratarse de un oncogén, como el c-myc, es de origen viral, y a no ser que este poliomavirus se encuentre latente en los cerebros de los afectados por estas enfermedades, no es candidato relevante como desencadenante de la patología. No obstante, en nuestro laboratorio, se ha desarrollado paralelamente otro modelo de reentrada en ciclo forzada mediante el uso de una proteína de fusión que comprende una

isoforma de la ciclina E resistente a degradación (presente en cáncer de mama) unida a su Cdk2 (Walton et al., 2018). Este tándem, junto con la transfección de un dominante negativo de p53, induce el paso de fase G<sub>1</sub> a S al igual que el TAg, lo cual indica que nuestro sistema, a pesar de no ser fisiológico, desencadena los mismos mecanismos que en una patología.

Con ello, hemos encontrado que un alto porcentaje de las neuronas transfectadas con TAg son capaces de incorporar BrdU (**Fig. 14**). También hemos observado que esta reentrada en ciclo requiere de al menos 48 horas hasta alcanzar este porcentaje máximo, siendo un proceso lento en comparación con la duración estándar de la fase G<sub>1</sub> en precursores corticales de ratón, cuyo rango está entre las 3,2-12,4 horas (Takahashi et al., 1995). Esta cinética ralentizada podría ser característica del estado neuronal diferenciado, en el cual se requiere un tiempo para la relocalización de moléculas de las rutas propias de ciclo, que en neuronas se encuentran realizando otras funciones.

Por otro lado, con objeto de aislar los efectos directos y específicos de la reentrada en ciclo, evitando efectos colaterales de la propia expresión del TAg, hemos utilizado la forma mutante de TAg E107K (K1). K1 es incapaz de inducir la entrada en ciclo al no poder unirse y, por consiguiente, bloquear las proteínas de la familia del retinoblastoma (pRb, p130 y p107), mientras que sí es capaz de bloquear las cascadas dependientes de p53 y Fbw7. Utilizando este control no se observó incorporación de BrdU en neuronas, ni aumento en la ploidía (**Fig. 19**), ni una cinética de muerte (**Fig. 22**) ni características electrofisiológicas ni estructurales (**Fig. 29 y Fig. 31**) diferentes a las del otro control LacZ. Todos estos resultados nos permiten concluir que los efectos inducidos en las neuronas por TAg son específicos de la inducción del ciclo celular.

### **La reentrada en ciclo mediante TAg presenta distintas poblaciones neuronales**

Al analizar el curso temporal del incremento de ploidía se observó la aparición de neuronas con contenido en ADN superior al diploide (2C) (**Fig. 17**). En concreto, nuestro estudio identificó hasta cuatro poblaciones distintas. Estas poblaciones aparecen probablemente debido a la existencia de respuestas diferentes ante la reentrada en ciclo en las neuronas. En el presente trabajo no se ha identificado la naturaleza específica de cada población, sin embargo, mediante los resultados obtenidos y basándonos en la literatura previa hemos propuesto el posible recorrido molecular de estas poblaciones.

Tras la reactivación de ciclo encontramos una población de neuronas que son refractarias a la incorporación de BrdU (30 %) (**Fig. 14**). El 70 % de neuronas restante sí son capaces de incorporar este nucleósido análogo de la timidina. Esta población

mayoritaria de neuronas entra en fase S y alcanza niveles de ploidía que se mantienen en torno a 2C o diploide, 4C o tetraploide, o superior a 4C o poliploides (**Fig. 17**).

En primer lugar, respecto a aquellas neuronas transfectadas con TAg que no presentan signos de entrada en fase de replicación, no podemos asumir que no haya habido una reactivación del ciclo. En el análisis de supervivencia, éstas mueren con la misma cinética que aquellas que replican su ADN, ya que en caso contrario, la proporción de neuronas BrdU positivas disminuiría significativamente a los 4 dpt (**Fig. 22**). En este caso es probable que las neuronas que no incorporan BrdU en respuesta a TAg hayan pasado de  $G_0$  a  $G_1$ , y sin embargo el paso a S no haya podido ser completado con éxito. Una posible explicación de la muerte de esta población puede ser un exceso de activación de E2F1 que es capaz de desembocar muerte celular mediante mecanismos independientes de p53, como sería el caso de nuestro modelo (Roworth et al., 2015).

Por otro lado, la mayoría de las neuronas transfectadas con TAg son capaces de superar el *checkpoint* entre  $G_1$  y S y replicar su ADN, pues incorporan BrdU. Dentro de esta población se encuentran principalmente las neuronas con contenido de ADN tetraploide, que incorporan BrdU en las primeras 48 horas y no vuelven a realizar otro ciclo (**Fig. 18**). También dentro de este grupo se encuentran las neuronas que presentan contenido poliploide, las cuales habrían sufrido un proceso de endoreplicación ya que 48 horas después del primer ciclo siguen incorporado BrdU y, por lo tanto, replicando su ADN (**Fig. 18**). Por último, una cuarta subpoblación es la constituida por aquellas neuronas que presentan incorporación de BrdU pero sus niveles de ploidía son mantenidos entorno a 2C (**Fig. 17**). Todos estos resultados ponen de manifiesto la diversidad de poblaciones existentes, lo cual sugiere un control diferencial de los distintos *checkpoints* que presenta una célula una vez que está dentro de fase de replicación.

Uno de los puntos de control del ciclo celular es el *checkpoint* dentro de la propia fase S (Saldivar et al., 2017). Éste tiene como principal objetivo prevenir el colapso de las horquillas de replicación y regular la dinámica de la activación de los distintos orígenes de replicación para evitar estrés replicativo. Por ello, ante la detección de roturas del ADN sencillas (DSS) o dobles (DBS), se activa la respuesta a daño genómico (DDR) a través de la cascada de señalización de los dos efectores ATM/ATR que desencadena en la activación a las proteínas Chk2/Chk1, respectivamente, parando la progresión del ciclo en fase S (Saldivar et al., 2017). Ambos efectores, ATM y ATR, poseen estímulos de iniciación y activación de sustratos diferentes y específicos. Sin embargo, al ser en sentido general, respuestas complementarias y simultáneas, las trataremos como una sola ruta molecular

(rutas caracterizadas y revisadas en Shiotani and Zou, 2009, Saldivar et al., 2017, Blackford and Jackson, 2017).

Otro *checkpoint* corresponde a la transición entre las fases G<sub>2</sub>/M. Éste depende de nuevo de la cascada ATM/ATR y puede ser activado ante la detección de la presencia de daño en el ADN o de fallo en la replicación (Manic et al., 2015). Sin embargo, mientras que en el *checkpoint* dentro de S tiene como principal diana a Cdk2, en este último la diana es Cdk1, la cual es inhibida a través de la activación de Wee1/Myt1 y la inhibición de la fosforilación de las fosfatasas Cdc25 (Blackford and Jackson, 2017), forzando la detención de la célula en fase G<sub>2</sub> e impidiendo la entrada en mitosis.

Con objeto de conocer si las neuronas transfectadas con TAg que incorporan BrdU habrían podido sufrir activación de alguno de estos *checkpoints*, determinando su destino celular y niveles de ploidía, realizamos un análisis de un indicador de daño genómico y un marcador de fase G<sub>2</sub> tardía (fase previa a la entrada en M). Por un lado, se realizó un estudio de  $\gamma$ -H2AX fosforilada (**Fig. 20**). Se trata de un marcador muy común de daño de ADN, cuya función en la DDR consiste en reclutar factores de reparación y acercar los extremos del ADN rotos más próximos para llevar a cabo la reparación. Se ha observado que un incremento de los focos y marcaje pan-nuclear de  $\gamma$ -H2AX correlaciona con la cantidad de daño en el ADN (Meyer et al., 2013). En línea con esto, nuestros resultados sugerirían que a 2 dpt, momento de máxima replicación, las neuronas que han reentrado en ciclo presentan una mayor activación de la cascada de DDR. Además a los 6 dpt, cuando la supervivencia de estas neuronas es mínima, el tipo de marcaje es similar al de los controles (LacZ y K1), indicando que las neuronas que permanecen no presentarían esta activación a la respuesta de DDR. Cabe destacar la situación especial que presenta el control LacZ, el cual muestra marcaje pan-nuclear en un porcentaje de las neuronas a 2 dpt. Una posible explicación sería que la propia transfección del plásmido podría provocar la activación de la quinasa ADN-PK, tercera efectora de la DDR junto con ATM/ATR, causando una señal pan-nuclear de la  $\gamma$ -H2AX fosforilada. Sin embargo, este marcaje de  $\gamma$ -H2AX no sería derivado de una DDR como tal ya que estas neuronas transfectadas con LacZ nunca reactivan ciclo y, por lo tanto, no se activan las cascadas de ATM/ATR necesarias para desencadenar la DDR completa (Quanz et al., 2009, Walton et al., 2018).

En conclusión, la presencia de este patrón de  $\gamma$ -H2AX en las neuronas que han reentrado en ciclo sugiere la posibilidad de que el daño en el ADN se configure como el proceso desencadenante de la parada en el ciclo de estas poblaciones de neuronas a consecuencia de la activación de los *checkpoint* dentro de S o G<sub>2</sub>/M. No obstante, la activación de la DDR en las neuronas transfectadas con TAg no está aún caracterizada. Para

ello, sería necesario apoyarse en otros marcadores que determinen la presencia de roturas en el ADN y de los otros efectores de la respuesta, ya que se trata de procesos complejos que activan cascadas complementarias en función de las circunstancias (Shiotani and Zou, 2009, de Feraudy et al., 2010). Esto está en consonancia con el aumento de expresión de  $\gamma$ -H2AX nuclear en individuos con AD en comparación con los individuos control de las mismas edades (Silva et al., 2014), respaldando la hipótesis de activación de una DDR como consecuencia de una reentrada aberrante en el ciclo en neuronas.

Por otro lado, con objeto de conocer si las neuronas que han superado la fase de replicación alcanzan las siguientes fases del ciclo, realizamos un análisis del marcaje de fosfo-histona H3 (pH3). Ésta es susceptible de ser fosforilada en su extremo N-terminal libre provocando cambios conformacionales en la estructura del ADN y regulando procesos de transcripción o de condensación para dar lugar a una potencial división de la célula (Hans and Dimitrov, 2001). En mamíferos, esta fosforilación ya se detecta en fase tardía de G<sub>2</sub> y continúa desde profase, metafase y anafase, hasta que comienza el proceso de defosforilación en la telofase temprana (Hendzel et al., 1997). Nuestros resultados indican que alrededor de la mitad de las neuronas que han pasado por fase de replicación llegan a su vez a fase G<sub>2</sub> tardía (**Fig. 21**). El otro porcentaje de neuronas que no presentan marcaje pH3 pero sí presentan incorporación de BrdU podría corresponder con la población de neuronas que aunque han iniciado la replicación del ADN, mantiene los niveles de ploidía en torno a 2C o aquellas que están en endoreplicación. Esto sería posible si hubiese ocurrido una activación del *checkpoint* dentro de S y la neurona se hubiese visto obligada a parar la incorporación de BrdU (**Fig. 17 y Fig. 18**). Por otro lado, la ausencia general de marcaje de pH3 pan-nuclear típico de las primeras etapas de fase M (Hendzel et al., 1997, Crosio et al., 2002) sugiere que la mayoría de las neuronas no son capaces de superar el *checkpoint* de G<sub>2</sub>/M.

En el caso de que hubiese habido parada en G<sub>2</sub> a consecuencia de DDR, la activación del *checkpoint* G<sub>2</sub>/M aunque no es dependiente de la ruta p53/p21 para iniciar el proceso de parada, sí que parece serlo para el mantenimiento de esta detención (Taylor and Stark, 2001, Baus et al., 2003, Jackson et al., 2005, Stark and Taylor, 2006). En las neuronas que han reactivado ciclo mediante la expresión de TAG, p53 se encuentra bloqueado, y como consecuencia, no hay activación de las cascadas dependientes, como la que activa a p21, proteína que se une a múltiples factores de transcripción y quinasas para el control de una buena progresión del ciclo celular (Roninson, 2002, Kulaberoglu et al., 2016). No obstante, se ha observado inducción de p21 a través de Chk2 activado en ausencia de p53 funcional (Aliouat-Denis et al., 2005, Lossaint et al., 2011). No se puede descartar que esto podría

ocurrir en nuestro modelo con TAg, al bloquearse así el paso a fase M. p21 además de establecer una inhibición en las quinasas que favorecerían este paso, también tiene un papel sobre las proteínas de la familia del retinoblastoma (pRb, p107 y p130). p21 se encarga de bloquear la hiperfosforilación de las proteínas de la familia del retinoblastoma en etapas posteriores a G<sub>1</sub> ante un daño genómico, y promover la salida de ciclo de la célula en G<sub>2</sub> (Baus et al., 2003). No obstante, en condiciones en las que pRb sigue hiperfosforilado, es decir, sin inhibir a los factores de transcripción E2F, en fase G<sub>2</sub>, las células sufren re-replicación en respuesta a daño en el ADN (Flatt et al., 2000) o terminan muriendo antes de entrar en mitosis, seguramente por el conjunto de señales de parada de ciclo versus división (Baus et al., 2003). Son necesarios más análisis en el futuro para determinar qué tipo de muerte concreta sufren las neuronas que reactivan ciclo mediante TAg. Sin embargo, todo parece indicar que la convergencia de señales constitutivas de progresión en el ciclo, la activación complementaria de rutas de control y parada de éste, junto con el deterioro a nivel sináptico derivado de la propia reentrada en ciclo celular en una neurona diferenciada comprometerían la viabilidad celular.

Por último, la población de neuronas con TAg que presentan contenidos de ploidía superiores a 4C podrían haber sufrido un proceso de endoreplicación. La re-replicación es un evento que tiene lugar cuando por una parte se suprime la división celular y por otra, la actividad de las Cdk2 se alterna para que ocurra la replicación del genoma sin que haya mitosis, es decir, se produce un salto de G<sub>2</sub> a fase S de nuevo. En este proceso es importante la fluctuación de ciclina E-Cdk2, APC/C<sup>Cdh1</sup> (que es fosforilada por ciclina E-Cdk2 e inactivada) y geminina (que a su vez es degradada por APC) (Zielke et al., 2008). Este proceso de endoreplicación también ocurre en otros procesos celulares como es el caso de la existencia de daño en los telómeros, los extremos de los cromosomas en las células eucariotas encargados de dar estabilidad estructural. En ausencia de p53, se activa la cascada ATM/ATR, igual que ocurre en la DDR, la cual junto con la expresión cíclica de geminina y la ausencia de activación de las Cdk2 mitóticas se induce un incremento en la ploidía en fibroblastos (Davoli et al., 2010). También, se observó endoreplicación en células epiteliales humanas como consecuencia de un tamaño aberrante de telómeros y pérdida de pRb, en lugar de p53 (Pampalona et al., 2012). En relación con esto, se sabe que los hepatocitos con Rb mutado, a pesar de tener daño genómico, sufren un proceso de endoreplicación dando lugar a células poliploides. Asimismo, este fenotipo parece ser dependiente del tipo de tejido o célula ya que aparece específicamente en el hígado y no en otros tejidos gastrointestinales. Es decir, cada tejido y por lo tanto cada tipo celular puede requerir distintos mecanismos y señales para sufrir endoreplicación o no (Bourgo et al., 2011, Fox and Duronio, 2013). De hecho, en el sistema nervioso de los vertebrados

superiores no se ha detectado niveles de ploidía por encima de tetraploidía (López-Sánchez et al., 2011). Otros ejemplos se han observado en estudios en hígado de ratón durante el desarrollo en los que se ha mostrado que ante la pérdida de Rb se da un aumento en la ploidía sin provocar la aparición de cáncer, incluso en combinación con p53 (McClendon et al., 2011). Finalmente, se ha observado cómo células embrionarias de ratón que carecen de Rb y p53 sufren endoreplicación presentando sus telómeros desprotegidos, y dando lugar a aneuploidía y tumorigénesis en las células derivadas de las siguientes divisiones (Davoli et al., 2010). Todos estos estudios podrían explicar el proceso de endoreplicación generado en neuronas por la expresión de TAg, el cual reprime tanto a pRb como a p53.

### **La reentrada en ciclo induce muerte neuronal progresiva**

Nuestros resultados muestran un proceso de muerte progresiva en las neuronas que han reentrado en ciclo a partir del 3 dpt en comparación con ambos controles LacZ y K1 (**Fig. 22**). Sin embargo, los mecanismos de muerte celular que sufren estas neuronas están todavía por determinar. Nuestros datos sugieren que se trata de un tipo de muerte independiente de apoptosis o estrés oxidativo (**Fig. 23 y Fig. 24**). Los resultados de nuestro modelo *in vitro* de AD se contraponen, por tanto, a la hipótesis acerca del destino apoptótico de una neurona siempre que reactiva aberrantemente el ciclo (Kruman, 2004, Folch et al., 2012, Absalon et al., 2013). En el estudio de la propia enfermedad de AD existe controversia en cuanto a la presencia o no de marcadores apoptóticos (Su et al., 1994, Dragunow et al., 1995, Smale et al., 1995 versus Migheli et al., 1994, Dickson, 1995, Selznick et al., 1999, Jellinger and Stadelmann, 2001), así como del papel que desempeña el estrés oxidativo (Wang et al., 2014, Scheff et al., 2016, Tonnies and Trushina, 2016). Al tratarse de una enfermedad neurodegenerativa que puede requerir varios años hasta la aparición del deterioro cognitivo sería menos probable que la muerte neuronal sea consecuencia de un insulto severo con efecto inmediato (Zhu et al., 2007), tal y como sería un tipo de muerte apoptótica. Otro tipo de muerte distinta de la apoptótica e independiente de p53 es la necrosis. La sobreactivación de la DDR es capaz de activar a la proteína nuclear PARP1, que induce a su vez hiperactivación mitocondrial y producción descontrolada de ATP, llevando a la muerte celular (Shin et al., 2015). Por otro lado, un incremento en la expresión de E2F1 regula los niveles de expresión de genes involucrados en autofagia, como LC3, ATG1, ATG5 y DRAM (Tracy et al., 2007, Polager and Ginsberg, 2008, Jiang et al., 2010). Se sabe, asimismo, que una desregulación del flujo autofágico podría contribuir al proceso de muerte neuronal (Boland et al., 2008, Nixon and Yang, 2011, Li et al., 2017). En definitiva, los procesos que conlleven tanto atrofia progresiva, como la pérdida sináptica gradual o la pérdida del mantenimiento homeostático celular. Es decir, una acumulación de fallos en la

supervivencia celular, se configurarían como candidatos responsables más firmes de la desaparición de neuronas que han reactivado ciclo (Busser et al., 1998, Herrup and Yang, 2007).

### **Relación entre ciclo celular y mecanismos sinápticos en neuronas**

Debido a la intensa participación de las moléculas responsables del ciclo celular en la funcionalidad sináptica en neuronas diferenciadas (Huang et al., 2002, Barr et al., 2004, Konishi et al., 2004, Cruz and Tsai, 2004b, Morabito et al., 2004, Huang et al., 2005, Giovanni et al., 2006, Seeburg et al., 2008, Maestre et al., 2008, Frank and Tsai, 2009, Mori et al., 2009, Trunova et al., 2011, Odajima et al., 2011, Su and Tsai, 2011), la reentrada en ciclo de las neuronas inducida por el TAg se tradujo, como era esperable, en alteraciones en su actividad sináptica. Por un lado, se observó una reducción significativa del AIS en las neuronas que expresan TAg (**Fig. 30**), lo cual correlaciona con una disminución significativa en la frecuencia de disparo de PAs que estas neuronas son capaces de descargar (**Fig. 28 y Fig. 29**). Curiosamente, el acortamiento del AIS representa una alteración neuronal destacada en modelos murinos de AD (Sun et al., 2014, Marin et al., 2016). Por otro lado, quinasas con relación directa o indirecta con el ciclo son, a su vez, encargadas de mecanismos moleculares de la plasticidad del AIS (Bréchet et al., 2008, Vacher et al., 2011, del Puerto et al., 2015). Por ejemplo, se ha observado que tanto Cdk2, imprescindible en el paso de G<sub>1</sub> a S, como Cdk5 regulan el tráfico y acumulación de los canales dependientes de voltaje K<sub>v1</sub> en el AIS (Vacher et al., 2011). En el caso de Cdk5, además, se ha observado que su actividad junto con p35 tiene un papel clave en la regulación esta estructura, ya que un descenso en su actividad provoca una recolocación proximal y un acortamiento de la longitud de una estructura similar al AIS en *Drosophila* (Trunova et al., 2011). Con todo ello, es posible que una reentrada en ciclo desembocase en una deslocalización funcional por parte de estas quinasas hacia sus dianas de ciclo celular, provocando una desregulación del AIS y una perturbación en la capacidad de disparo de esas neuronas.

Por otra parte, nuestros datos muestran una disminución significativa tanto de la amplitud como de la frecuencia de los eventos sinápticos espontáneos registrados en las neuronas que han reactivado el ciclo (**Fig. 28 y Fig 29**). De manera complementaria, también se han detectado niveles reducidos de la proteína estructural PSD-95 (**Fig. 32**), relevante para la formación y funcionamiento de las sinapsis glutamatérgicas (Hunt et al., 1996). Puesto que PSD-95 es la proteína responsable de organizar y concentrar a los receptores de los neurotransmisores así como moléculas de señalización en el botón postsináptico (Kim and Sheng, 2004), la reducción de sus niveles correlaciona con la disminución de la amplitud de los eventos sinápticos espontáneos, la cual podría



relacionarse con una posible reducción de receptores AMPA y NMDA presentes en las sinapsis.

Frente a estos déficits sinápticos en las neuronas que han reactivado el ciclo, hemos explorado si un ambiente despolarizante favorecería una recuperación parcial de estas propiedades. En el caso de la capacidad de disparo y del AIS, no hay recuperación tras este estímulo crónico, siendo coherente con el mantenimiento de la longitud de AIS disminuida en condiciones de elevada actividad (Evans et al., 2015). Tras una despolarización crónica, las neuronas control tienen disminuida tanto la amplitud como la frecuencia de los eventos sinápticos espontáneos recibidos, acompañado de una disminución en la densidad del PSD-95 (**Fig. 32**). Este fenómeno puede ser un proceso de adaptación homeostática, mecanismo mediante el cual las neuronas adaptarían su frecuencia de disparo y externalizarían o internalizarían los receptores postsinápticos de membrana tras una fase de excitación o depresión crónica (Seeburg et al., 2008, Su and Tsai, 2011, Su et al., 2012). En el caso de las neuronas que han reactivado ciclo tanto los niveles de PSD-95 como las propiedades activas de los eventos sinápticos espontáneos se mantienen en los mismos niveles que en el caso control, indicando que hay una mejora, al no haber disminución de los niveles de esta proteína (**Fig. 32**). Estos resultados son consistentes con la capacidad de despolarización de la membrana de regular la plasticidad sináptica en neuronas corticales (Baker et al., 1992, Wang et al., 1994). En relación con los eventos que pueden estar ocurriendo en las neuronas que han entrado en ciclo, sabemos que Cdk5 y Plk2, por ejemplo, tienen roles relevantes en la regulación de las cascadas de señalización en la homeostasis sináptica (Seeburg et al., 2008, Su and Tsai, 2011, Su et al., 2012). En periodos de alta actividad sináptica, como en nuestro modelo de despolarización crónica con KCl, tanto la fosforilación de la proteína SPAR por Cdk5 como la unión de la primera a Plk2 son necesarias para inducir la degradación de PSD-95 y, así, regular la respuesta sináptica ante este ambiente (Seeburg et al., 2008, Evers et al., 2010). Si por el contrario, Cdk5 no se encuentra activo para desencadenar esta cascada, la degradación de PSD-95 no tiene lugar. Este mecanismo se propone como posible explicación de la bajada de densidad de esta proteína estructural en las neuronas control, y del mantenimiento y no disminución de la misma proteína en las neuronas que han reactivado ciclo.

Adicionalmente, las condiciones de alta actividad durante la despolarización crónica generaron una potenciación de la supervivencia de las neuronas que han reactivado el ciclo (**Fig. 32**). Estos resultados sugieren que un estado eléctricamente activo y dinámico del entorno donde se encuentran estas neuronas puede ser en parte responsable de ralentizar

el proceso degenerativo (Edwards et al., 1991, Ling et al., 1991, Isacson, 1993, Yang et al., 2001, Yang et al., 2003, Arendt et al., 2010a, Bell and Hardingham, 2011).

En resumen, debido a que las rutas efectoras del ciclo celular como de la maquinaria que regulan los procesos sinápticos tienen protagonistas en común, es razonable que la reactivación aberrante de ciclo mediante la expresión de TAg desencadene un daño en la plasticidad sináptica, y en última instancia, afecte a la supervivencia. Por el contrario, un descontrol de las señales derivadas de la plasticidad sináptica podría provocar una reentrada en ciclo aberrante (Arendt, 2003).

Para determinar el impacto de la reactivación de ciclo en neuronas adultas sobre sus propiedades funcionales y el desarrollo del proceso de neurodegeneración es necesario el establecimiento de un modelo *in vivo*. Parte de estos estudios se encuentran en el **Anexo IV**.

### **Modelo de red neuronal de reentrada en ciclo y silenciamiento celular**

En la última parte del trabajo se desarrolló un modelo de red neuronal para analizar el efecto global de la reentrada en ciclo o hiperploidez en la población simulada. Los resultados (**Fig. 34 y Fig. 35**) revelan el impacto de la reactivación de ciclo en la capacidad de las neuronas para emitir potenciales de acción. El silenciamiento de porcentajes crecientes de las distintas poblaciones simuladas generó efectos variables. Si bien no se conoce la vulnerabilidad de los distintos tipos celulares ante la reactivación de ciclo, es probable un panorama heterogéneo en diferentes estadios y patologías neurodegenerativas. Cabe destacar la comorbilidad entre variantes genéticas de AD y epilepsia (Palop et al., 2007), a la que podría subyacer un silenciamiento específico de interneuronas, tal y como ejemplifica el modelo (**Fig. 12**). Por otra parte, aquellas neuronas excitatorias con mayor frecuencia de disparo requieren mayor síntesis proteica y demanda de las rutas metabólicas celulares, lo que podría exponerlas a un mayor riesgo de reactivación de ciclo al haber más posibilidades de desregulación de las rutas celulares. Cabe destacar que el silenciamiento de las células líderes (con mayor frecuencia de disparo) genera efectos en la red comparables al silenciamiento de una fracción similar de células excitatorias, a pesar de que las segundas son un orden de magnitud más numerosas. Por ejemplo, el silenciamiento de un 40 % de ambas poblaciones (1360 células excitatorias propiamente dichas frente a 80 líderes) disminuye la frecuencia de disparo poblacional aproximadamente 0.2 Hz. Podríamos concluir que la vulnerabilidad selectiva sobre aquellas células con mayor actividad tendría mayor impacto sobre el sistema (Lusch et al., 2018).

Nuestro modelo neuronal es capaz de producir ciertos motivos oscilatorios con características similares a los observados en el cerebro. Es más, el silenciamiento de ciertos

poblaciones celulares indujo una disminución específica de la banda espectral *gamma*, también disminuida en AD (Gillespie et al., 2016, Nakazono et al., 2017). Como esperábamos, los efectos en la frecuencia de disparo fueron anteriores y más notables al deterioro de *gamma*, lo que pone en relevancia mecanismos compensatorios de la red diseñada, característicos de sistemas complejos como el cerebro.

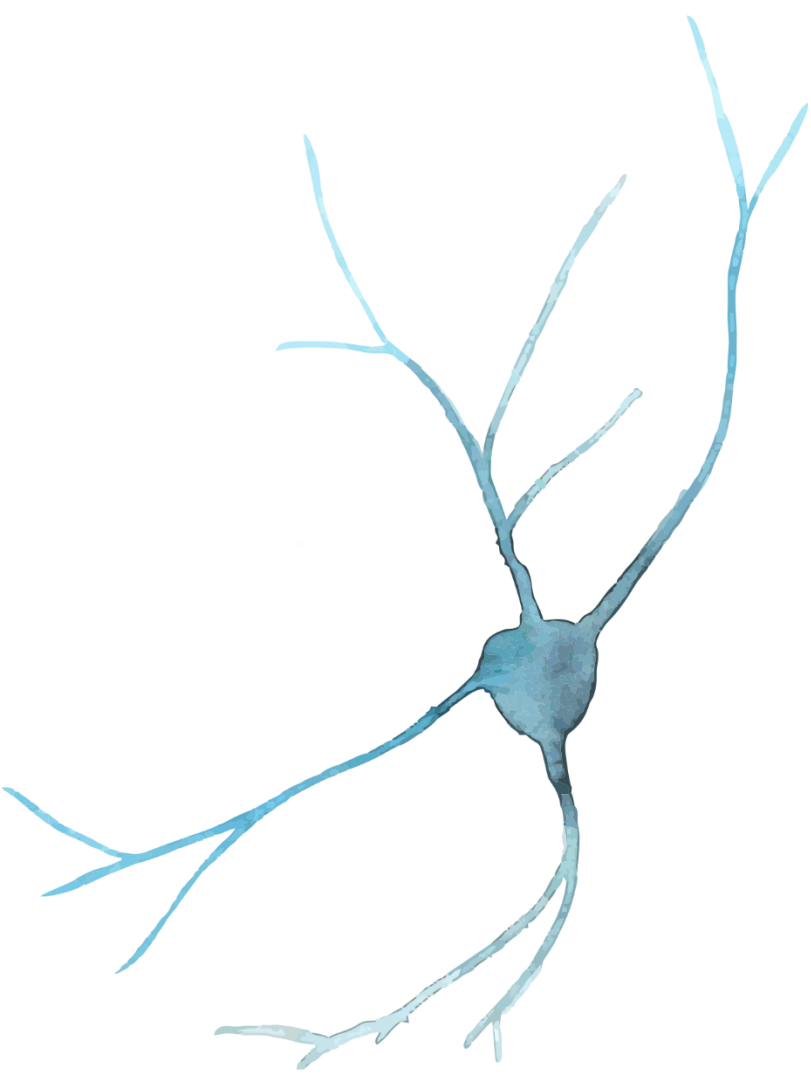
En definitiva, la presencia de neuronas que han sufrido una reactivación de ciclo aberrante y se mantienen integradas en el circuito con capacidades de integración de la información eléctrica deterioradas tiene un impacto en la red, tal y como podría ocurrir en las enfermedades neurodegenerativas como AD.

\*      \*      \*

Cuando una neurona diferenciada e integrada en una red compleja reactiva el ciclo celular de manera aberrante se desencadenan una serie de procesos avocados a la neurodegeneración.

Las ciclinas y Cdks responsables de la coordinación del ciclo celular están involucradas en la regulación de la plasticidad sináptica en neuronas maduras (Frank and Tsai, 2009, Su and Tsai, 2011). Por ello, ante señales de reactivación de ciclo, la maquinaria neuronal sufre alteraciones en la sinapsis así como en la maquinaria especializada en integrar las señales eléctricas recibidas, lo cual, en conjunto deriva en graves defectos funcionales. Estas moléculas protagonistas en el ciclo son también capaces de fosforilar la proteína tau en múltiples sitios (Baumann et al., 1993, Schmetsdorf et al., 2009), lo que llevaría a la formación de ovillos neurofibrilares (Bonda et al., 2009). Es factible, asimismo, que la reentrada en ciclo pudiese a su vez desregular el sistema de ubiquitización, alterado en AD (Tan et al., 2007, Tank and True, 2009), que favorecería la agregación y acumulación de proteínas (Haapasalo et al., 2010). De la misma manera, se han demostrado efectos en el metabolismo de APP por parte de moléculas implicadas en el ciclo, con la consiguiente aparición de las placas de  $\beta$ -amiloide (Suzuki et al., 1994). Finalmente, la acumulación de  $\beta$ -amiloide en el espacio extracelular afecta a la funcionalidad sináptica de las neuronas vecinas (Kayed and Lasagna-Reeves, 2013, Canter et al., 2016).

Se ha demostrado que el 10 % de las neuronas corticales humanas tienen cantidad de ADN superior a la diploide, siendo alrededor de un 2 % tetraploides (Mosch et al., 2007, López-Sánchez et al., 2017a). Si bien estos porcentajes son relativamente pequeños, otros factores, tales como la vulnerabilidad de tipos celulares específicos, factores ambientales y factores genéticos necesariamente convergen en el desarrollo de la neurodegeneración.

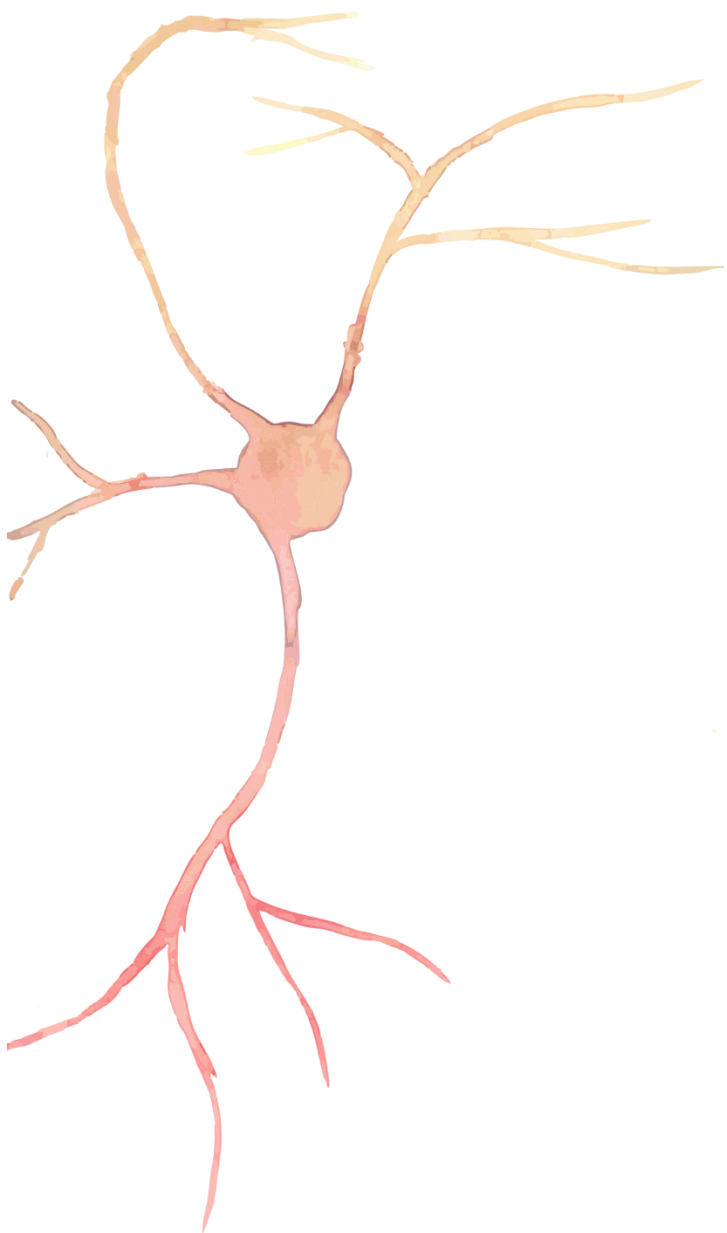




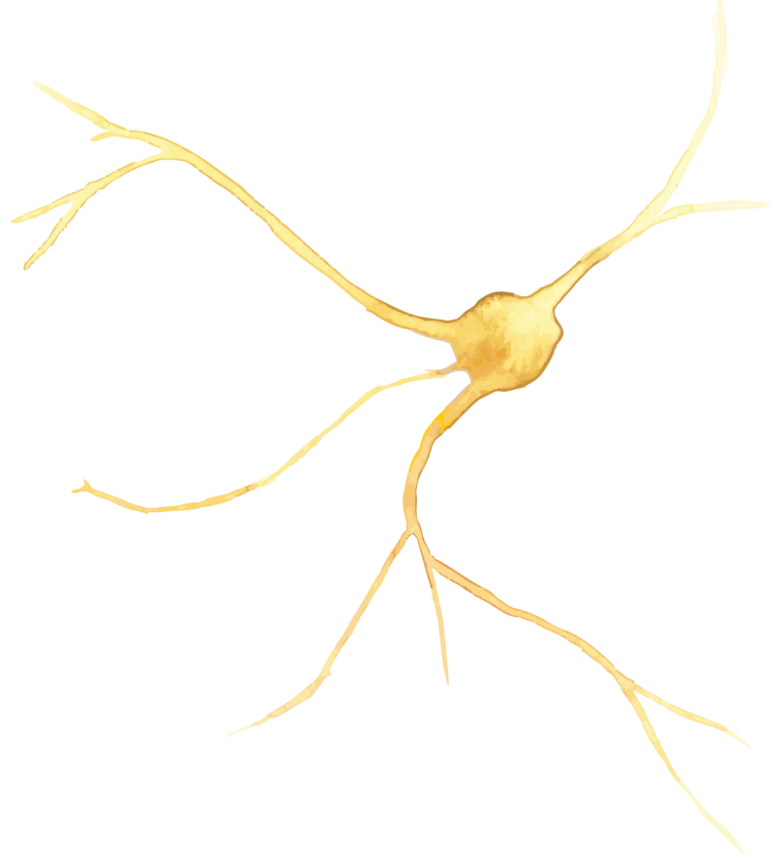
# CONCLUSIONES

1. La mayoría de las neuronas corticales de ratón son capaces de reentrar en ciclo celular mediante la expresión de TAg. Tras la reactivación de ciclo son capaces de sobrevivir durante días hasta degenerar a través de mecanismos independientes de apoptosis o estrés oxidativo.
2. La reentrada en ciclo en neuronas mediante TAg presenta varias subpoblaciones con distinto contenido en ploidía. Mientras una población se convierte en tetraploide, otra sufre un proceso de endoreplicación adquiriendo contenido poliploide y otra población mantiene sus niveles de ploidía entorno a 2C. La presencia de marcadores de daño genómico y fase del ciclo G<sub>2</sub> tardía sugieren destinos distintos de cada población neuronal que ha reactivado su ciclo celular.
3. Las neuronas que han reentrado en ciclo celular son eléctricamente activas aunque presentan actividad sináptica alterada, siendo un perfil que corresponde con una pérdida progresiva del segmento inicial del axón, así como una disminución en los niveles de la proteína postsináptica PSD-95.
4. Un aumento en la actividad eléctrica en los cultivos celulares favorece parcialmente tanto la supervivencia neuronal de aquellas células que han reactivado ciclo como la estabilización en los niveles de PSD-95.
5. La presencia de neuronas hiperploides o silentes en una red neuronal afecta de manera variable y diferencial a la frecuencia de disparo del resto de las neuronas integradas en la red y a las oscilaciones generadas.
6. Nuestros resultados sugieren una fuerte interacción y control entre la entrada aberrante al ciclo celular en neuronas adultas y la disfunción sináptica en el desarrollo de la neurodegeneración en AD.









# BIBLIOGRAFÍA



- ABRAHAM, R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*, 15, 2177-2196.
- ABSALON, S., KOCHANNEK, D. M., RAGHAVAN, V. & KRICHEVSKY, A. M. 2013. MiR-26b, Upregulated in Alzheimer's Disease, Activates Cell Cycle Entry, Tau-Phosphorylation, and Apoptosis in Postmitotic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 33, 14645-14659.
- AL-UBAIDI, M. R., HOLLYFIELD, J. G., OVERBEEK, P. A. & BAEHR, W. 1992. Photoreceptor degeneration induced by the expression of simian virus 40 large tumor antigen in the retina of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 1194-1198.
- ALIOUAT-DENIS, C.-M., DENDOUGA, N., DEN WYNGAERT, I., GOEHLMANN, H., STELLER, U., VAN DE WEYER, I., SLYCKEN, N., ANDRIES, L., KASS, S., LUYTEN, W., JANICOT, M. & VIALARD, J. E. 2005. p53-Independent Regulation of p21Waf1/Cip1 Expression and Senescence by Chk2. *Molecular Cancer Research*, 3, 627-634.
- ALMEIDA, C. G., TAMPELLINI, D., TAKAHASHI, R. H., GREENGARD, P., LIN, M. T., SNYDER, E. M. & GOURAS, G. K. 2005. Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiology of Disease*, 20, 187-198.
- AMON, A., IRNIGER, S. & NASMYTH, K. 1994. Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell*, 77, 1037-1050.
- AN, P., ROBLES, M. & PIPAS, J. M. 2012. Large T Antigens of Polyomaviruses: Amazing Molecular Machines. *Microbiology*, 66, 213-236.
- ANGLADA, T., TERRADAS, M., HERNÁNDEZ, L., GENESCA, A. & MARTÍN, M. 2016. Analysis of Residual DSBs in Ataxia-Telangiectasia Lymphoblast Cells Initiating Apoptosis. *BioMed Research International*, 2016, 1-12.
- APLIN, A. E., GIBB, G. M., JACOBSEN, S. J., GALLO, J. M. & ANDERTON, B. H. 1996. In Vitro Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain of the Amyloid Precursor Protein by Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ . *Journal of Neurochemistry*, 67, 699-707.
- ARENDR, T. 2003. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Progress in Neurobiology*, 71, 83-248.
- ARENDR, T. 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118, 167-179.

- ARENDR, T., BRÜCKNER, M. K., MOSCH, B. & LÖSCHE, A. 2010. Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 177, 15-20.
- BAKER, R. E., VERMEULEN, J. P. & BOER, G. J. 1992. NMDA receptor levels in chronically depolarized long-term neonatal rat neocortical explants. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 10, 413-419.
- BARBOUR, B. 2014. Electronics for electrophysiologists. *Creative commons*. [http://www.biologie.ens.fr/~barbour/electronics\\_for\\_electrophysiologists.pdf](http://www.biologie.ens.fr/~barbour/electronics_for_electrophysiologists.pdf)
- BARR, F. A., SILLJÉ, H. H. W. & NIGG, E. A. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5.
- BARTEK, J., LUKAS, C. & LUKAS, J. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 792-804.
- BATS, C., GROG, L. & CHOQUET, D. 2007. The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron*, 53, 719-734.
- BAUMANN, K., MANDELKOW, E. M., BIERNAT, J., PIWNICA-WORMS, H. & MANDELKOW, E. 1993. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Letters*, 336, 417-424.
- BAUS, F., GIRE, V., FISHER, D., PIETTE, J. & DULIĆ, V. 2003. Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *The EMBO Journal*, 22, 3992-4002.
- BECKERMAN, R. & PRIVES, C. 2010. Transcriptional Regulation by P53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2.
- BELL, K. F. S. & HARDINGHAM, G. E. 2011. The influence of synaptic activity on neuronal health. *Current Opinion in Neurobiology*, 21, 299-305.
- BENILOVA, I., KARRAN, E. & STROOPER, B. 2012. The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nature Neuroscience*, 15, 349.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L., & MACARULLA, J. M. (2003). Bioquímica. Barcelona, Reverte.
- BERTONI-FREDDARI, C., FATTORETTI, P., CASOLI, T., CASELLI, U. & MEIER-RUGE, W. 1996. Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*, 18, 209-213.

- BESSON, A., DOWDY, S. F. & ROBERTS, J. M. 2008. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell*, 14, 159-169.
- BHASKAR, K., MILLER, M., CHLUDZINSKI, A., HERRUP, K., ZAGORSKI, M. & LAMB, B. T. 2009. The PI3K-Akt-mTOR pathway regulates A $\beta$  oligomer induced neuronal cell cycle events. *Molecular Neurodegeneration*, 4, 14.
- BLACKFORD, A. N. & JACKSON, S. P. 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 66, 801-817.
- BOLAND, B., KUMAR, A., LEE, S., PLATT, F. M., WEGIEL, J., YU, H. W. & NIXON, R. A. 2008. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 28.
- BONDA, D. J., EVANS, T. A., SANTOCANALE, C., LLOSÁ, J., VIÑA, J., BAJIC, V. P., CASTELLANI, R. J., SIEDLAK, S. L., PERRY, G., SMITH, M. A. & LEE, H.-G. 2009. Evidence for the progression through S-phase in the ectopic cell cycle re-entry of neurons in Alzheimer disease. *Aging*, 1, 382-388.
- BOURGO, R. J., EHMER, U., SAGE, J. & KNUDSEN, E. S. 2011. RB deletion disrupts coordination between DNA replication licensing and mitotic entry in vivo. *Molecular Biology of the Cell*, 22, 931-939.
- BRAAK, H. & BRAAK, E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82, 239-259.
- BRADY, C. A., JIANG, D., MELLO, S. S., JOHNSON, T. M., JARVIS, L. A., KOZAK, M. M., BROZ, D., BASAK, S., PARK, E. J., MCLAUGHLIN, M. E., KARNEZIS, A. N. & ATTARDI, L. D. 2011. Distinct p53 Transcriptional Programs Dictate Acute DNA-Damage Responses and Tumor Suppression. *Cell*, 145, 571-583.
- BRÉCHET, A., FACHE, M.-P., BRACHET, A., FERRACCI, G., BAUDE, A., IRONDELLE, M., PEREIRA, S., LETERRIER, C. & DARGENT, B. 2008. Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *The Journal of Cell Biology*, 183, 1101-1114.
- BROWN, D. F., RISSER, R. C., BIGIO, E. H., TRIPP, P., STIEGLER, A., WELCH, E., EAGAN, K. P., HLADIK, C. L. & WHITE, C. L. 1998. Neocortical Synapse Density and Braak Stage in the Lewy Body Variant of Alzheimer Disease: A Comparison with Classic Alzheimer Disease and Normal Aging. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 57, 955-960.

- BRUMBERG, J. C., NOWAK, L. G. & MCCORMICK, D. A. 2000. Ionic Mechanisms Underlying Repetitive High-Frequency Burst Firing in Supragranular Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience*, 20, 4829-4843.
- BRUN, A., LIU, X. & ERIKSON, C. 1995. Synapse Loss and Gliosis in the Molecular Layer of the Cerebral Cortex in Alzheimer's Disease and in Frontal Lobe Degeneration. *Neurodegeneration*, 4, 171-177.
- BUSSER, J., GELDMACHER, D. S. & HERRUP, K. 1998. Ectopic Cell Cycle Proteins Predict the Sites of Neuronal Cell Death in Alzheimer's Disease Brain. *Journal of Neuroscience*, 18, 2801-2807.
- CALLAHAN, L. M., VAULES, W. A. & COLEMAN, P. D. 2002. Progressive Reduction of Synaptophysin Message in Single Neurons in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61, 384-395.
- CÁNEPA, E. T., SCASSA, M. E., CERUTI, J. M., MARAZITA, M. C., CARCAGNO, A. L., SIRKIN, P. F. & OGARA, M. F. 2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*, 59, 419-426.
- CANTER, R. G., PENNEY, J. & TSAI, L.-H. 2016. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature*, 539, 187-196.
- CHANG, K.-A., KIM, H.-S., HA, T.-Y., HA, J.-W., SHIN, K., JEONG, Y., LEE, J.-P., PARK, C.-H., KIM, S., BAIK, T.-K. & SUH, Y.-H. 2006. Phosphorylation of Amyloid Precursor Protein (APP) at Thr668 Regulates the Nuclear Translocation of the APP Intracellular Domain and Induces Neurodegeneration. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 4327-4338.
- CHANG, K.-H., VINCENT, F. & SHAH, K. 2012. Deregulated Cdk5 triggers aberrant activation of cell cycle kinases and phosphatases inducing neuronal death. *J Cell Sci*, 125, 5124-5137.
- CHEN, B.-S. & ROCHE, K. W. 2007. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology*, 53, 362-368.
- CHEN, L., CHETKOVICH, D. M., PETRALIA, R. S., SWEENEY, N. T., KAWASAKI, Y., WENTHOLD, R. J., BRETT, D. S. & NICOLL, R. A. 2000. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*, 408, 936.
- CIPRIANI, B., BORSELLINO, G., KNOWLES, H., TRAMONTI, D., CAVALIERE, F., BERNARDI, G., BATTISTINI, L. & BROSAN, C. F. 2001. Curcumin Inhibits Activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells by Phosphoantigens and Induces Apoptosis Involving Apoptosis-Inducing

- Factor and Large Scale DNA Fragmentation. *The Journal of Immunology*, 167, 3454-3462.
- CLINTON, J., BLACKMAN, S., ROYSTON, C. M. & ROBERTS, G. W. 1994. Differential synaptic loss in the cortex in Alzheimer's disease: a study using archival material. *NeuroReport*, 5, 497.
- COLLEDGE, M., SNYDER, E. M., CROZIER, R. A., SODERLING, J. A., JIN, Y., LANGEBERG, L. K., LU, H., BEAR, M. F. & SCOTT, J. D. 2003. Ubiquitination Regulates PSD-95 Degradation and AMPA Receptor Surface Expression. *Neuron*, 40, 595-607.
- CROSIO, C., FIMIA, G., LOURY, R., KIMURA, M., OKANO, Y., ZHOU, H., SEN, S., ALLIS, D. C. & SASSONE-CORSI, P. 2002. Mitotic Phosphorylation of Histone H3: Spatio-Temporal Regulation by Mammalian Aurora Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 874-885.
- CRUZ, J. C. & TSAI, L.-H. 2004a. Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 10, 452-458.
- CRUZ, J. C. & TSAI, L.-H. 2004b. A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 14, 390-394.
- DAVIES, C. A., MANN, D. M. A., SUMPTER, P. Q. & YATES, P. O. 1987. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 78, 151-164.
- DAVOLI, T., DENCHI, E. & DE LANGE, T. 2010. Persistent Telomere Damage Induces Bypass of Mitosis and Tetraploidy. *Cell*, 141, 81-93.
- DE FERAUDY, S., REVET, I., BEZROOKOVE, V., FEENEY, L. & CLEAVER, J. E. 2010. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of  $\gamma$ H2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 6870-6875.
- DEKOSKY, S. T., HARBAUGH, R. E., SCHMITT, F. A., BAKAY, R. A. E., CHUI, H., KNOPMAN, D. S., REEDER, T. M., SHETTER, A. G., SENTER, H. J., MARKESBERY, W. R. & GROUP, T. 1992. Cortical biopsy in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. *Annals of Neurology*, 32, 625-632.
- DEKOSKY, S. T. & SCHEFF, S. W. 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology*, 27, 457-464.

- DEKOSKY, S. T., SCHEFF, S. W. & STYREN, S. D. 1996. Structural Correlates of Cognition in Dementia: Quantification and Assessment of Synapse Change. *Neurodegeneration*, 5, 417-421.
- DEL PUERTO, A., FRONZAROLI-MOLINIERES, L., PEREZ-ALVAREZ, M., GIRAUD, P., CARLIER, E., WANDOSELL, F., DEBANNE, D. & GARRIDO, J. 2015. ATP-P2X7 Receptor Modulates Axon Initial Segment Composition and Function in Physiological Conditions and Brain Injury. *Cerebral Cortex*, 25, 2282-2294.
- DEPAMPHILIS, M. L., DE RENTY, C. M., ULLAH, Z. & LEE, C. Y. 2012. "The Octet": Eight Protein Kinases that Control Mammalian DNA Replication. *Frontiers in Physiology*, 3, 368.
- DICKSON, D. W. 1995. Apoptosis in the brain. Physiology and pathology. *The American journal of pathology*, 146.
- DICKSON, D. W., CRYSTAL, H. A., BEVONA, C., HONER, W., VINCENT, I. & DAVIES, P. 1995. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiology of Aging*, 16, 285-298.
- DOSEMECI, A., TAO-CHENG, J.-H., VINADE, L., WINTERS, C. A., POZZO-MILLER, L. & REESE, T. S. 2001. Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 10428-10432.
- DRAGUNOW, M., FAULL, R. L. M., LAWLOR, P., BEILHARZ, E. J., SINGLETON, K., WALKER, E. B. & MEE, E. 1995. In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *NeuroReport*, 6, 1053.
- DUNCAN, A. W. 2013. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24, 347-356.
- EDWARDS, S. N., BUCKMASTER, A. E. & TOLKOVSKY, A. M. 1991. The Death Programme in Cultured Sympathetic Neurones Can Be Suppressed at the Posttranslational Level by Nerve Growth Factor, Cyclic AMP, and Depolarization. *Journal of Neurochemistry*, 57, 2140-2143.
- ESTERAS, N., ALQUÉZAR, C., BARTOLOMÉ, F., DE LA ENCARNACIÓN, A., BERMEJO-PAREJA, F., MOLINA, J. A. A. & MARTÍN-REQUERO, Á. 2015. G1/S Cell Cycle Checkpoint Dysfunction in Lymphoblasts from Sporadic Parkinson's Disease Patients. *Molecular neurobiology*, 52, 386-398.
- EVANS, MARK D., DUMITRESCU, ADNA S., KRUIJSSEN, DENNIS L. H., TAYLOR, SAMUEL E. & GRUBB, MATTHEW S. 2015. Rapid Modulation of Axon Initial Segment Length Influences Repetitive Spike Firing. *Cell Reports*, 13.



- EVERS, D. M., MATTA, J. A., HOE, H.-S., ZARKOWSKY, D., LEE, S., ISAAC, J. T. & PAK, D. T. S. 2010. Plk2 attachment to NSF induces homeostatic removal of GluA2 during chronic overexcitation. *Nature Neuroscience*, 13.
- FARD, S., JARRIN, M., BOIJE, H., FILLON, V., ALL-ERIKSSON, C. & HALLBÖÖK, F. 2013. Heterogenic Final Cell Cycle by Chicken Retinal Lim1 Horizontal Progenitor Cells Leads to Heteroploid Cells with a Remaining Replicated Genome. *PLoS ONE*, 8.
- FEDDERSEN, R. M., EHLENFELDT, R., YUNIS, W. S., CLARK, H. B. & ORR, H. T. 1992. Disrupted cerebellar cortical development and progressive degeneration of Purkinje cells in SV40 T antigen transgenic mice. *Neuron*, 9, 955-966.
- FLATT, P. M., TANG, L., SCATENA, C. D., SZAK, S. T. & PIETENPOL, J. A. 2000. p53 Regulation of G2 Checkpoint Is Retinoblastoma Protein Dependent. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 4210-4223.
- FLOYD, S., PINES, J. & LINDON, C. 2008. APC/CCdh1 Targets Aurora Kinase to Control Reorganization of the Mitotic Spindle at Anaphase. *Current Biology*, 18, 1649-1658.
- FOLCH, J., JUNYENT, F., VERDAGUER, E., AULADELL, C., PIZARRO, J. G., BEAS-ZARATE, C., PALLÀS, M. & CAMINS, A. 2012. Role of Cell Cycle Re-Entry in Neurons: A Common Apoptotic Mechanism of Neuronal Cell Death. *Neurotoxicity Research*, 22, 195-207.
- FOX, D. T. & DURONIO, R. J. 2013. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development*, 140, 3-12.
- FRADE, J. M. & OVEJERO-BENITO, M. C. 2015. Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle*, 14, 712-720.
- FRANK, C. L. & TSAI, L.-H. 2009. Alternative Functions of Core Cell Cycle Regulators in Neuronal Migration, Neuronal Maturation, and Synaptic Plasticity. *Neuron*, 62, 312-326.
- FREEMAN, R. S., ESTUS, S. & JOHNSON, E. M. 1994. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: Selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron*, 12, 343-355.
- FU, A. K. Y., HUNG, K.-W., FU, W.-Y., SHEN, C., CHEN, Y., XIA, J., LAI, K.-O. & IP, N. Y. 2011. APCCdh1 mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nature Neuroscience*, 14, 181.
- GARRIDO, J., GIRAUD, P., CARLIER, E., FERNANDES, F., MOUSSIF, A., FACHE, M.-P., DEBANNE, D. & DARGENT, B. 2003. A Targeting Motif Involved in Sodium Channel Clustering at the Axonal Initial Segment. *Science*, 300, 2091-2094.

- GIBSON, P. H. 1983. EM study of the numbers of cortical synapses in the brains of ageing people and people with Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathologica*, 62, 127-133.
- GILLESPIE, A. K., JONES, E. A., LIN, Y.-H., KARLSSON, M. P., KAY, K., YOON, S., TONG, L. M., NOVA, P., CARR, J. S., FRANK, L. M. & HUANG, Y. 2016. Apolipoprotein E4 Causes Age-Dependent Disruption of Slow Gamma Oscillations during Hippocampal Sharp-Wave Ripples. *Neuron*, 90, 740-751.
- GILLIAMS-FRANCIS, K. L., QUAYE, A. A. & NAEGELE, J. R. 2003. PARP cleavage, DNA fragmentation, and pyknosis during excitotoxin-induced neuronal death. *Experimental Neurology*, 184, 359-372.
- GIOVANNI, S., KNIGHTS, C. D., RAO, M., YAKOVLEV, A., BEERS, J., CATANIA, J., AVANTAGGIATI, M. & FADEN, A. I. 2006. The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration. *The EMBO Journal*, 25, 4084-4096.
- GLENNER, G. G. & WONG, C. W. 1984. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120, 885-890.
- GOLDBERG, E. M., CLARK, B. D., ZAGHA, E., NAHMANI, M., ERISIR, A. & RUDY, B. 2008. K<sup>+</sup> Channels at the Axon Initial Segment Dampen Near-Threshold Excitability of Neocortical Fast-Spiking GABAergic Interneurons. *Neuron*, 58, 387-400.
- GONG, Y., LIPPA, C. F., ZHU, J., LIN, Q. & ROSSO, A. L. 2009. Disruption of glutamate receptors at Shank-postsynaptic platform in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1292, 191-198.
- GOOD, P. F., WERNER, P., HSU, A., OLANOW, C. W. & PERL, D. P. 1996. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 149, 21-28.
- GOODMAN, D. F. M. & BRETTE, R. 2008. Brian: a simulator for spiking neural networks in Python. *Frontiers in Neuroinformatics*, 2, 5.
- GOODMAN, D. F. M. & BRETTE, R. 2009. The Brian simulator. *Frontiers in Neuroscience*, 3, 26.
- GRUBB, M. S. & NATURE, B.-J. 2010. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*.

- GYLYS, K., FEIN, J. A., YANG, F., WILEY, D. J., MILLER, C. A. & COLE, G. M. 2004. Synaptic Changes in Alzheimer's Disease Increased Amyloid- $\beta$  and Gliosis in Surviving Terminals Is Accompanied by Decreased PSD-95 Fluorescence. *The American Journal of Pathology*, 165, 1809-1817.
- HAAPASALO, A., VISWANATHAN, J., BERTRAM, L., SOININEN, H., TANZI, R. E. & HILTUNEN, M. 2010. Emerging role of Alzheimer's disease-associated ubiquitin-1 in protein aggregation. *Biochemical Society Transactions*, 38, 150-155.
- HAGTING, A., DEN ELZEN, N., VODERMAIER, H. C., WAIZENEGGER, I. C., PETERS, J.-M. & PINES, J. 2002. Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *The Journal of Cell Biology*, 157, 1125-1137.
- HALL, A. M. & ROBERSON, E. D. 2012. Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 88, 3-12.
- HAN, K. & KIM, E. 2008. Synaptic adhesion molecules and PSD-95. *Progress in Neurobiology*, 84, 263-283.
- HANS, F. & DIMITROV, S. 2001. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, 20, 1204-1216.
- HARBOUR, J. W., LUO, R. X., SANTI, A., POSTIGO, A. A. & DEAN, D. C. 1999. Cdk Phosphorylation Triggers Sequential Intramolecular Interactions that Progressively Block Rb Functions as Cells Move through G1. *Cell*, 98, 859-869.
- HARRIS, K. D., HIRASE, H., LEINEKUGEL, X., HENZE, D. A. & BUZSÁKI, G. 2001. Temporal Interaction between Single Spikes and Complex Spike Bursts in Hippocampal Pyramidal Cells. *Neuron*, 32, 141-149.
- HATANPÄÄ, K., ISAACS, K. R., SHIRAO, T., BRADY, D. R. & RAPOPORT, S. I. 1999. Loss of Proteins Regulating Synaptic Plasticity in Normal Aging of the Human Brain and in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58, 637-643.
- HAYASHI, T., SAKAI, K., SASAKI, C., ZHANG, W. R. & ABE, K. 2000. Phosphorylation of retinoblastoma protein in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 26, 390-397.
- HEFFERNAN, J. M., EASTWOOD, S. L., NAGY, Z., SANDERS, M. W., MCDONALD, B. & HARRISON, P. J. 1998. Temporal Cortex Synaptophysin mRNA Is Reduced in

- Alzheimer's Disease and Is Negatively Correlated with the Severity of Dementia. *Experimental Neurology*, 150, 235-239.
- HENDZEL, M. J., WEI, Y., MANCINI, M. A., HOOSER, A., RANALLI, T., BRINKLEY, B. R., BAZETT-JONES, D. P. & ALLIS, D. C. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106, 348-360.
- HENGARTNER, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 35037710.
- HERMAN, C. J. & LAPHAM, L. W. 1968. DNA Content of Neurons in the Cat Hippocampus. *Science*, 160, 537-537.
- HERMANNSTÄDTER, A., ZIEGLER, C., KÜHL, M., DEPPERT, W. & TOLSTONOG, G. V. 2009. Wild-Type p53 Enhances Efficiency of Simian Virus 40 Large-T-Antigen-Induced Cellular Transformation. *Journal of Virology*, 83, 10106-10118.
- HERNÁNDEZ-ORTEGA, K., FERRERA, P. & ARIAS, C. 2007. Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 1744-1751.
- HERRUP, K. & YANG, Y. 2007. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nature Reviews Neuroscience*, 8.
- HÖGLINGER, G. U., BREUNIG, J. J., DEPBOYLU, C., ROUAUX, C., MICHEL, P. P., ALVAREZ-FISCHER, D., BOUTILLIER, A.-L., DEGREGORI, J., OERTEL, W. H., RAKIC, P., HIRSCH, E. C. & HUNOT, S. 2007. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 3585-3590.
- HONER, W. G., DICKSON, D. W., GLEESON, J. & DAVIES, P. 1992. Regional synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 13, 375-382.
- HRADEK, A. C., LEE, H.-P., SIEDLAK, S. L., TORRES, S. L., JUNG, W., HAN, A. H. & LEE, H.-G. 2015. Distinct Chronology of Neuronal Cell Cycle Re-Entry and Tau Pathology in the 3xTg-AD Mouse Model and Alzheimer's Disease Patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 43, 57-65.
- HSU, J. Y., REIMANN, J., SØRENSEN, C. S., LUKAS, J. & JACKSON, P. K. 2002. E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APCCdh1. *Nature Cell Biology*, 4.

- HUANG, Y. S., JUNG, M. Y., SARKISSIAN, M. & RICHTER, J. D. 2002. N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and  $\alpha$ CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *The EMBO Journal*, 21, 2139-2148.
- HUANG, Z., ZANG, K. & REICHARDT, L. F. 2005. The origin recognition core complex regulates dendrite and spine development in postmitotic neurons. *The Journal of Cell Biology*, 170, 527-535.
- HUNT, C. A., SCHENKER, L. J. & KENNEDY 1996. PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *Journal of Neuroscience*, 16, 1380-1388.
- HWANG, H. C. & CLURMAN, B. E. 2005. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*, 24, 1208613.
- HYMAN, B. T., HOESEN, V. G. W., KROMER, L. J. & DAMASIO, A. R. 1986. Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 20, 472-481.
- IJIMA, K. I., ANDO, K., TAKEDA, S., SATOH, Y., SEKI, T., ITOHARA, S., GREENGARD, P., KIRINO, Y., NAIRN, A. C. & SUZUKI, T. 2000. Neuron-Specific Phosphorylation of Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein by Cyclin-Dependent Kinase 5. *Journal of Neurochemistry*, 75, 1085-1091.
- IQBAL, K., LIU, F. & GONG, C.-X. 2016. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nature Reviews Neurology*, 12, 15.
- IQBAL, K., LIU, F., GONG, C. X. & GRUNDKE-IQBAL, I. 2010. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer research*, 7, 656-664.
- ISACSON, O. 1993. On neuronal health. *Trends in Neurosciences*, 16, 306-308.
- JACKMAN, M., LINDON, C., NIGG, E. A. & PINES, J. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature Cell Biology*, 5.
- JACKSON, M. W., AGARWAL, M. K., YANG, J., BRUSS, P., UCHIUMI, T., AGARWAL, M. L., STARK, G. R. & TAYLOR, R. 2005. p130/p107/p105Rb-dependent transcriptional repression during DNA-damage-induced cell-cycle exit at G2. *Journal of Cell Science*, 118, 1821-1832.
- JELLINGER, K. A. & STADELMANN, C. 2001. Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 3, 31-40.

- JENKINS, S. M. & BIOL, B.-V. J. 2001. Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol.*
- JIANG, H., MARTIN, V., GOMEZ-MANZANO, C., JOHNSON, D. G., ALONSO, M., WHITE, E., XU, J., MCDONNELL, T. J., SHINOJIMA, N. & FUEYO, J. 2010. The RB-E2F1 Pathway Regulates Autophagy. *Cancer Research*, 70, 7882-7893.
- JONES, S. L. & SVITKINA, T. M. 2016. Axon Initial Segment Cytoskeleton: Architecture, Development, and Role in Neuron Polarity. *Neural Plasticity*, 2016, 6808293.
- JORDAN-SCIUTTO, K. L., MALAIYANDI, L. M. & BOWSER, R. 2002. Altered Distribution of Cell Cycle Transcriptional Regulators during Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61, 358-367.
- JUDGE, M., HORNBECK, L., POTTER, H. & PADMANABHAN, J. 2011. Mitosis-specific phosphorylation of amyloid precursor protein at Threonine 668 leads to its altered processing and association with centrosomes. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 80.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., & JESSELL, T. M. (2000). Principles of neural science. New York, McGraw-Hill, Health Professions Division.
- KASAI, H., MATSUZAKI, M., NOGUCHI, J., YASUMATSU, N. & NAKAHARA, H. 2003. Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, 26, 360-368.
- KAUFMAN, M. H. (2014). The atlas of mouse development.
- KAWAUCHI, T. 2014. Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease. *Development, Growth & Differentiation*, 56, 335-348.
- KAYED, R. & LASAGNA-REEVES, C. A. 2013. Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33.
- KEPECS, A., WANG, X.-J. & LISMAN, J. 2002. Bursting Neurons Signal Input Slope. *Journal of Neuroscience*, 22, 9053-9062.
- KHALIQ, Z. M. & RAMAN, I. M. 2006. Relative contributions of axonal and somatic Na channels to action potential initiation in cerebellar Purkinje neurons. *Journal of Neuroscience*, 26, 1935-1944.
- KHATOON, S., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. 1994. Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Letters*, 351, 80-84.

- KIM, E. & SHENG, M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 5.
- KIMURA, T., ISHIGURO, K. & HISANAGA, S.-I. 2014. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 65.
- KIROUAC, L., RAJIC, A. J., CRIBBS, D. H. & PADMANABHAN, J. 2017. Activation of Ras-ERK Signaling and GSK-3 by Amyloid Precursor Protein and Amyloid Beta Facilitates Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *eNeuro*, 4, 16.
- KNIGHT, B. W. 1972. Dynamics of Encoding in a Population of Neurons. *The Journal of General Physiology*, 59, 734-766.
- KOJIMA, T., IKAWA, Y. & KATOH, I. 2001. Analysis of Molecular Interactions of the p53-Family p51(p63) Gene Products in a Yeast Two-Hybrid System: Homotypic and Heterotypic Interactions and Association with p53-Regulatory Factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281, 1170-1175.
- KOLE, M. H., ILSCHNER, S. U., KAMPA, B. M. M., WILLIAMS, S. R., RUBEN, P. C. & STUART, G. J. 2008. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature neuroscience*, 11, 178-186.
- KOLUPAEVA, V. & JANSSENS, V. 2013. PP1 and PP2A phosphatases – cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation. *FEBS Journal*, 280, 627-643.
- KOMADA, M. & SORIANO, P. 2002. [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *The Journal of cell biology*, 337-348.
- KONISHI, Y., STEGMÜLLER, J., MATSUDA, T., BONNI, S. & BONNI, A. 2004. Cdh1-APC Controls Axonal Growth and Patterning in the Mammalian Brain. *Science*, 303, 1026-1030.
- KOPS, G. J. P. L., WEAVER, B. A. A. & CLEVELAND, D. W. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Reviews Cancer*, 5, 773-785.
- KOUSHOLT, A. N., MENZEL, T. & SØRENSEN, C. S. 2012. Pathways for Genome Integrity in G2 Phase of the Cell Cycle. *Biomolecules*, 2.
- KRAFT, C., HERZOG, F., GIEFFERS, C., MECHTLER, K., HAGTING, A., PINES, J. & PETERS, J. M. 2003. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 22, 6598-6609.
- KRUMAN, I. I. 2004. Why do Neurons Enter the Cell Cycle? *Cell Cycle*, 3, 767-771.

- KUBA, H., OICHI, Y. & OHMORI, H. 2010. Presynaptic activity regulates Na<sup>+</sup> channel distribution at the axon initial segment. *Nature*, 465, 1075.
- KULABEROGLU, Y., GUNDOGDU, R. & HERGOVICH, A. 2016. Genome Stability. *Section V: Genome Stability in Mammals*, 243-256.
- LACAS-GERVAIS, S., GUO, J., STRENGKE, N., SCARFONE, E., KOLPE, M., JAHKEL, M., CAMILLI, P., MOSER, T., RASBAND, M. N. & SOLIMENA, M. 2004.  $\beta$ IV $\Sigma$ 1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments. *The Journal of Cell Biology*, 166, 983-990.
- LAPHAM, L. W. 1968. Tetraploid DNA Content of Purkinje Neurons of Human Cerebellar Cortex. *Science*, 159, 310-312.
- LAPICQUE, L. 1907. Recherches quantitatives sur l'excitation électrique des nerfs traitée comme une polarisation. *Journal of Physiol Pathol Générale*, 9, 620-635.
- LEE, H.-G., CASADESUS, G., NUNOMURA, A., ZHU, X., CASTELLANI, R. J., RICHARDSON, S. L., PERRY, G., FELSHER, D. W., PETERSEN, R. B. & SMITH, M. A. 2009. The Neuronal Expression of MYC Causes a Neurodegenerative Phenotype in a Novel Transgenic Mouse. *The American Journal of Pathology*, 174, 891-897.
- LEE, M.-S., KAO, S.-C., LEMERE, C. A., XIA, W., TSENG, H.-C., ZHOU, Y., NEVE, R., AHLIJANIAN, M. K. & TSAI, L.-H. 2003. APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *The Journal of Cell Biology*, 163, 83-95.
- LEE, Y.-J., HAN, S., NAM, S.-Y., OH, K.-W. & HONG, J. 2010. Inflammation and Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 1539-1556.
- LEUBA, G., SAVIOZ, A., VERNAY, A., CARNAL, B., KRAFTSIK, R., TARDIF, E., RIEDERER, I. & RIEDERER, B. 2008a. Differential Changes in Synaptic Proteins in the Alzheimer Frontal Cortex with Marked Increase in PSD-95 Postsynaptic Protein. *Journal of Alzheimer's Disease*, 15, 139-151.
- LEUBA, G., WALZER, C., VERNAY, A., CARNAL, B., KRAFTSIK, R., PIOTTON, F., MARIN, P., BOURAS, C. & SAVIOZ, A. 2008b. Postsynaptic density protein PSD-95 expression in Alzheimer's disease and okadaic acid induced neuritic retraction. *Neurobiology of Disease*, 30, 408-419.
- LI, Q., LIU, Y. & SUN, M. 2017. Autophagy and Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37, 377-388.



- LILYESTROM, W., KLEIN, M. G., ZHANG, R., JOACHIMIAK, A. & CHEN, X. S. 2006. Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. *Genes & Development*, 20, 2373-2382.
- LINDON, C. & PINES, J. 2004. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *The Journal of Cell Biology*, 164, 233-241.
- LING, D., PETROSKI, R. E. & GELLER, H. M. 1991. Both survival and development of spontaneously active rat hypothalamic neurons in dissociated culture are dependent on membrane depolarization. *Developmental Brain Research*, 59.
- LITTLEPAGE, L. E. & RUDERMAN, J. V. 2002. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes & Development*, 16, 2274-2285.
- LLINAS, R. R. 1988. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*, 242, 1654-1664.
- LOMBARDI, D. & LASAGNI, L. 2016. Cell Biology - New Insights. *intech*.
- LÓPEZ-SÁNCHEZ, N., FONTÁN-LOZANO, Á., PALLÉ, A., GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V., RÁBANO, A., TREJO, J. L. & FRADE, J. M. 2017a. Neuronal tetraploidization in the cerebral cortex correlates with reduced cognition in mice and precedes and recapitulates Alzheimer's-associated neuropathology. *Neurobiology of Aging*, 56, 50-66.
- LÓPEZ-SÁNCHEZ, N. & FRADE, J. M. 2013. Genetic Evidence for p75NTR-Dependent Tetraploidy in Cortical Projection Neurons from Adult Mice. *The Journal of Neuroscience*, 33, 7488-7500.
- LÓPEZ-SÁNCHEZ, N., OVEJERO-BENITO, M. C., BORREGUERO, L. & FRADE, J. M. 2011. Control of Neuronal Ploidy During Vertebrate Development. *Results and problems in cell differentiation*, 53.
- LÓPEZ-SÁNCHEZ, N., PATIÑO-PARRADO, I. & FRADE, J. 2017b. Genomic Mosaicism in Neurons and Other Cell Types. *springer*, 131, 57-80.
- LOSSAINT, G., BESNARD, E., FISHER, D., PIETTE, J. & DULIĆ, V. 2011. Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional. *Oncogene*, 30, 4261.
- LOVE, S., SIEW, K. L., DAWBARN, D., WILCOCK, G. K., BEN-SHLOMO, Y. & ALLEN, S. J. 2006. Premorbid effects of APOE on synaptic proteins in human temporal neocortex. *Neurobiology of Aging*, 27, 797-803.

- LU, P. J., WULF, G., ZHOU, X. Z., DAVIES, P. & NATURE, L.-K. P. 1999. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*.
- LUE, L.-F., BRACHOVA, L., CIVIN, H. W. & ROGERS, J. 1996. Inflammation, A $\beta$  Deposition, and Neurofibrillary Tangle Formation as Correlates of Alzheimer's Disease Neurodegeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 55, 1083-1088.
- LUSCH, B., WEHOLT, J., MAIA, P. D. & KUTZ, N. J. 2018. Modeling cognitive deficits following neurodegenerative diseases and traumatic brain injuries with deep convolutional neural networks. *Brain and cognition*, 123, 154-164.
- MACUREK, L., LINDQVIST, A. & MEDEMA, R. H. 2009. Aurora-A and hBora Join the Game of Polo. *Cancer Research*, 69, 4555-4558.
- MAESTRE, C., DELGADO-ESTEBAN, M., GOMEZ-SANCHEZ, J. C., BOLAÑOS, J. P. & ALMEIDA, A. 2008. Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *The EMBO Journal*, 27, 2736-2745.
- MAGEE, J. C. & CARRUTH, M. 1999. Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 82, 1895-1901.
- MAJD, S., ZARIFKAR, A., RASTEGAR, K. & TAKHSHID, M. 2008. Different fibrillar A 1-42 concentrations induce adult hippocampal neurons to reenter various phases of the cell cycle. *Brain research*, 1218, 224-229.
- MALUMBRES, M. & BARBACID, M. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30, 630-641.
- MANIC, G., OBRIST, F., SISTIGU, A. & VITALE, I. 2015. Trial Watch: Targeting ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways for anticancer therapy. *Molecular & Cellular Oncology*, 2.
- MARIN, M. A., ZIBURKUS, J., JANKOWSKY, J. & RASBAND, M. N. 2016. Amyloid- $\beta$  plaques disrupt axon initial segments. *Experimental Neurology*, 281, 93-98.
- MASLIAH, E. 1995. Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Histology and histopathology*, 10, 509-519.
- MASLIAH, E., MALLORY, M., ALFORD, M., DETERESA, R., HANSEN, L. A., MCKEEL, D. W. & MORRIS, J. C. 2001. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 56, 127-129.

- MASLIAH, E., MALLORY, M., HANSEN, L., RICHARD, D., ALFORD, M. & TERRY, R. 1994. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 174, 67-72.
- MASLIAH, E., TERRY, R. D., DETERESA, R. M. & HANSEN, L. A. 1989. Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neuroscience Letters*, 103, 234-239.
- MASSAGUÉ, J. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432.
- MCCLENDON, K. A., DEAN, J. L., ERTEL, A., FU, Z., RIVADENEIRA, D. B., REED, C. A., BOURGO, R. J., WITKIEWICZ, A., ADDYA, S., MAYHEW, C. N., GRIMES, L. H., FORTINA, P. & KNUDSEN, E. S. 2011. RB and p53 Cooperate to Prevent Liver Tumorigenesis in Response to Tissue Damage. *Gastroenterology*, 141, 1439-1450.
- MCGARRY, T. J. & KIRSCHNER, M. W. 1998. Geminin, an Inhibitor of DNA Replication, Is Degraded during Mitosis. *Cell*, 93, 1043-1053.
- MCNAMEE, L. M. & BRODSKY, M. H. 2009. p53-Independent Apoptosis Limits DNA Damage-Induced Aneuploidy. *Genetics*, 182, 423-435.
- MCSHEA, A., HARRIS, P. L., WEBSTER, K. R., WAHL, A. F. & SMITH, M. A. 1997. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 150, 1933-1939.
- MCSHEA, A., LEE, H.-G., PETERSEN, R. B., CASADESUS, G., VINCENT, I., LINFORD, N. J., FUNK, J.-O., SHAPIRO, R. A. & SMITH, M. A. 2007. Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772, 467-472.
- MEEKS, J. P. & MENNERICK, S. 2007. Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *Journal of neurophysiology*, 97, 3460-3472.
- MENDOZA, J., SEKIYA, M., TANIGUCHI, T., IJIMA, K. M., WANG, R. & ANDO, K. 2013. Global Analysis of Phosphorylation of Tau by the Checkpoint Kinases Chk1 and Chk2 *in vitro*. *Journal of Proteome Research*, 12, 2654-2665.
- MEYER, B., VOSS, K.-O., TOBIAS, F., JAKOB, B., DURANTE, M. & TAUCHER-SCHOLZ, G. 2013. Clustered DNA damage induces pan-nuclear H2AX phosphorylation mediated by ATM and DNA-PK. *Nucleic Acids Research*, 41, 6109-6118.
- MIGHELI, A., CAVALLA, P., MARINO, S. & SCHIFFER, D. 1994. A Study of Apoptosis in Normal and Pathologic Nervous Tissue After In situ End-Labeling of DNA Strand Breaks. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 53, 606-616.

- MINELLA, A. C., GRIM, J. E., WELCKER, M. & CLURMAN, B. E. 2007. p53 and SCFFbw7 cooperatively restrain cyclin E-associated genome instability. *Oncogene*, 26, 1210518.
- MORABITO, M. A., SHENG, M. & TSAI, L.-H. 2004. Cyclin-Dependent Kinase 5 Phosphorylates the N-Terminal Domain of the Postsynaptic Density Protein PSD-95 in Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 24, 865-876.
- MORI, D., YAMADA, M., MIMORI-KIYOSUE, Y., SHIRAI, Y., SUZUKI, A., OHNO, S., SAYA, H., WYNshaw-BORIS, A. & HIROTSUNE, S. 2009. An essential role of the aPKC–Aurora A–NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nature Cell Biology*, 11.
- MORILLO, S. M., ABANTO, E. P., ROMÁN, M. J. J. & FRADE, J. M. M. 2012. Nerve growth factor-induced cell cycle reentry in newborn neurons is triggered by p38MAPK-dependent E2F4 phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, 32, 2722-2737.
- MORILLO, S. M., ESCOLL, P., DE LA HERA, A. & FRADE, J. M. 2010. Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 109-114.
- MOSCH, B., MORAWSKI, M., MITTAG, A., LENZ, D., TARNOK, A. & ARENDT, T. 2007. Aneuploidy and DNA Replication in the Normal Human Brain and Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 27, 6859-6867.
- MULLEN, R. J., BUCK, C. R. & SMITH, A. M. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development (Cambridge, England)*, 116, 201-211.
- MURESAN, Z. & MURESAN, V. 2005. Coordinated transport of phosphorylated amyloid-beta precursor protein and c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-1. *The Journal of cell biology*, 615-625.
- MUSACCHIO, A. & SALMON, E. D. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8.
- MUSERIDZE, D. P., SVANIDZE, I. K. & MACHARASHVILI, D. N. 1975. Content of DNA and dry weight of the nuclei of neurons of the external geniculate body and retina of the eye in guinea pigs. *The Soviet journal of developmental biology*, 5, 269-272.
- NAGY, Z., COMBRINCK, M., BUDGE, M. & MCSHANE, R. 2002. Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 317, 81-84.

- NAGY, Z., ESIRI, M. M., CATO, A. M. & NEUROPATHOLOGICA, S.-A. D. 1997. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*.
- NAKAZONO, T., LAM, T. N., PATEL, A. Y., KITAZAWA, M., SAITO, T., SAIDO, T. C. & IGARASHI, K. M. 2017. Impaired In Vivo Gamma Oscillations in the Medial Entorhinal Cortex of Knock-in Alzheimer Model. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11, 48.
- NASMYTH, K. 2002. Segregating Sister Genomes: The Molecular Biology of Chromosome Separation. *Science*, 297.
- NEVINS, J. R. 2001. The Rb/E2F pathway and cancer. *Human Molecular Genetics*, 10, 699-703.
- NICOLL, R. A., TOMITA, S. & BREDT, D. S. 2006. Auxiliary Subunits Assist AMPA-Type Glutamate Receptors. *Science*, 311, 1253-1256.
- NIGG, E. A. 2001. Cell division: Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2.
- NIIKURA, Y., DIXIT, A., SCOTT, R., PERKINS, G. & KITAGAWA, K. 2007. BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate. *The Journal of Cell Biology*, 178, 283-296.
- NIXON, R. A. & YANG, D.-S. 2011. Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect. *Neurobiology of Disease*, 43, 38-45.
- ODAJIMA, J., WILLS, Z. P., NDASSA, Y. M., TERUNUMA, M., KRETSCHMANNOVA, K., DEEB, T. Z., GENG, Y., GAWRZAK, S., QUADROS, I. M., NEWMAN, J., DAS, M., JECROIS, M. E., YU, Q., LI, N., BIENVENU, F., MOSS, S. J., GREENBERG, M. E., MARTO, J. A. & SICINSKI, P. 2011. Cyclin E Constrains Cdk5 Activity to Regulate Synaptic Plasticity and Memory Formation. *Developmental Cell*, 21, 655-668.
- OGAWA, O., LEE, H., ZHU, X., RAINA, A. & AGING ..., P. L. R. 2003. Increased p27, an essential component of cell cycle control, in Alzheimer's disease. *Aging ....*
- PALMER, L. M. & STUART, G. J. 2006. Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*.
- PALOP, J. J., CHIN, J., ROBERSON, E. D., WANG, J., THWIN, M. T., BIEN-LY, N., YOO, J., HO, K. O., YU, G.-Q., KREITZER, A., FINKBEINER, S., NOEBELS, J. L. & MUCKE, L. 2007. Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Neuron*, 55, 697-711.

- PAMPALONA, J., FRÍAS, C., GENESCÀ, A. & TUSELL, L. 2012. Progressive Telomere Dysfunction Causes Cytokinesis Failure and Leads to the Accumulation of Polyploid Cells. *PLoS Genetics*, 8.
- PAN, Z., KAO, T., HORVATH, Z., LEMOS, J., SUL, J.-Y., CRANSTOUN, S. D., BENNETT, V., SCHERER, S. S. & COOPER, E. C. 2006. A Common Ankyrin-G-Based Mechanism Retains KCNQ and NaV Channels at Electrically Active Domains of the Axon. *The Journal of Neuroscience*, 26, 2599-2613.
- PARK, K. H. J., HALLOWS, J. L., CHAKRABARTY, P., DAVIES, P. & VINCENT, I. 2007. Conditional Neuronal Simian Virus 40 T Antigen Expression Induces Alzheimer-Like Tau and Amyloid Pathology in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 27, 2969-2978.
- PELEGRÍ, C., DURAN-VILAREGUT, J., DEL VALLE, J., CRESPO-BIEL, N., FERRER, I., PALLÀS, M., CAMINS, A. & VILAPLANA, J. 2008. Cell cycle activation in striatal neurons from Huntington's disease patients and rats treated with 3-nitropropionic acid. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26, 665-671.
- PENAS, C., RAMACHANDRAN, V. & AYAD, N. 2012. The APC/C Ubiquitin Ligase: From Cell Biology to Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, 1, 60.
- PETERS, J.-M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7.
- PINES, J. 2011. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12.
- POEHLMANN, A., HABOLD, C., WALLUSCHECK, D., REISSIG, K., BAJBOUJ, K., ULLRICH, O., HARTIG, R., GALI-MUHTASIB, H., DIESTEL, A., ROESSNER, A. & SCHNEIDER-STOCK, R. 2011. Cutting edge: Chk1 directs senescence and mitotic catastrophe in recovery from G2 checkpoint arrest. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15, 1528-1541.
- POLAGER, S. & GINSBERG, D. 2008. E2F – at the crossroads of life and death. *Trends in Cell Biology*, 18, 528-535.
- PROCTOR, D. T., COULSON, E. J. & DODD, P. R. 2010. Reduction in Post-Synaptic Scaffolding PSD-95 and SAP-102 Protein Levels in the Alzheimer Inferior Temporal Cortex is Correlated with Disease Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease*, 21, 795-811.
- QUANZ, M., CHASSOUX, D., BERTHAULT, N., AGRARIO, C., SUN, J.-S. & DUTREIX, M. 2009. Hyperactivation of DNA-PK by Double-Strand Break Mimicking Molecules Disorganizes DNA Damage Response. *PLoS ONE*, 4.

- RANGANATHAN, S. & BOWSER, R. 2003. Alterations in G1 to S Phase Cell-Cycle Regulators during Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The American Journal of Pathology*, 162, 823-835.
- RICHARDSON, R. B. 2013. p53 mutations associated with aging-related rise in cancer incidence rates. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12, 2468-2478.
- ROCHE, K. W., STANDLEY, S., MCCALLUM, J., LY, D. C., EHLERS, M. D. & WENTHOLD, R. J. 2001. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature Neuroscience*, 4, 794-802.
- RONINSON, I. B. 2002. Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Letters*, 179, 1-14.
- ROWORTH, P. A., GHARI, F. & THANGUE, N. B. 2015. To live or let die – complexity within the E2F1 pathway. *Molecular & Cellular Oncology*, 2.
- RUDNER, A. D. & MURRAY, A. W. 2000. Phosphorylation by Cdc28 Activates the Cdc20-Dependent Activity of the Anaphase-Promoting Complex. *The Journal of Cell Biology*, 149, 1377-1390.
- SADASIVAM, S. & DECAPRIO, J. A. 2013. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nature Reviews Cancer*, 13.
- SALDIVAR, J. C., CORTEZ, D. & CIMPRICH, K. A. 2017. The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18.
- SAMUEL, W., ALFORD, M., HOFSTETTER, R. C. & HANSEN, L. 1997. Dementia with Lewy Bodies Versus Pure Alzheimer Disease: Differences in Cognition, Neuropathology, Cholinergic Dysfunction, and Synapse Density. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56, 499-508.
- SANZ-CLEMENTE, A., MATTA, J. A., ISAAC, J. & ROCHE, K. W. 2010. Casein Kinase 2 Regulates the NR2 Subunit Composition of Synaptic NMDA Receptors. *Neuron*, 67, 984-996.
- SAVIOZ, A., LEUBA, G. & VALLET, P. G. 2014. A framework to understand the variations of PSD-95 expression in brain aging and in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 18, 86-94.
- SCHAFER, D. P., JHA, S., LIU, F., AKELLA, T., MCCULLOUGH, L. D. & RASBAND, M. N. 2009. Disruption of the Axon Initial Segment Cytoskeleton Is a New Mechanism for Neuronal Injury. *The Journal of Neuroscience*, 29.

- SCHEFF, S. W., ANSARI, M. A. & MUFSON, E. J. 2016. Oxidative stress and hippocampal synaptic protein levels in elderly cognitively intact individuals with Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology of Aging*, 42.
- SCHEFF, S. W., DEKOSKY, S. T. & PRICE, D. A. 1990. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 11, 29-37.
- SCHEFF, S. W. & PRICE, D. A. 1993. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 33, 190-199.
- SCHEFF, S. W. & PRICE, D. A. 1998. Synaptic Density in the Inner Molecular Layer of the Hippocampal Dentate Gyrus in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 57, 1146-1153.
- SCHEFF, S. W. & PRICE, D. A. 2003. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiology of Aging*, 24, 1029-1046.
- SCHEFF, S. W., PRICE, D. A., SCHMITT, F. A. & MUFSON, E. J. 2006. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 27, 1372-1384.
- SCHMETSDORF, S., ARNOLD, E., HOLZER, M., ARENDT, T. & GÄRTNER, U. 2009. A putative role for cell cycle-related proteins in microtubule-based neuroplasticity. *European Journal of Neuroscience*, 29, 1096-1107.
- SCHWARTZ, E. I., SMILENOV, L. B., PRICE, M. A., OSREDKAR, T., BAKER, R. A., GHOSH, S., SHI, F.-D., VOLLMER, T. L., LENCINAS, A., STEARNS, D. M., GOROSPE, M. & KRUMAN, I. I. 2007. Cell Cycle Activation in Postmitotic Neurons is Essential for DNA Repair. *Cell Cycle*, 6, 318-329.
- SEEBURG, D. P., FELIU-MOJER, M., GAIOTTINO, J., PAK, D. & SHENG, M. 2008. Critical Role of CDK5 and Polo-like Kinase 2 in Homeostatic Synaptic Plasticity during Elevated Activity. *Neuron*, 58, 571-583.
- SEKI, A., COPPINGER, J. A., JANG, C.-Y., YATES, J. R. & FANG, G. 2008. Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry. *Science*, 320, 1655-1658.
- SELKOE, D. J. & HARDY, J. 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8, 595-608.
- SELZNICK, L. A., HOLTZMAN, D. M., HAN, B., GÖKDEN, M., SRINIVASAN, A. N., JOHNSON, E. M. & ROTH, K. A. 1999. In Situ Immunodetection of Neuronal Caspase-3 Activation



- in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58, 1020-1026.
- SERRANO, J., FERNÁNDEZ, A. P., MARTÍNEZ-MURILLO, R. & MARTÍNEZ, A. 2010. High sensitivity to carcinogens in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease. *Oncogene*, 29.
- SEWARD, M. E., SWANSON, E., NORAMBUENA, A., REIMANN, A., COCHRAN, N. J., LI, R., ROBERSON, E. D. & BLOOM, G. S. 2013. Amyloid- $\beta$  signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease. *J Cell Sci*, 126, 1278-1286.
- SHAH, M. M., MIGLIORE, M., VALENCIA, I., COOPER, E. C. & BROWN, D. A. 2008. Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 7869-7874.
- SHENG, M. & KIM, E. 2011. The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3.
- SHERR, C. J. & ROBERTS, J. M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13, 1501-1512.
- SHIN, H.-J., KWON, H.-K., LEE, J.-H., GUI, X., ACHEK, A., KIM, J.-H. & CHOI, S. 2015. Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. *Scientific Reports*, 5, 15798.
- SHIOTANI, B. & ZOU, L. 2009. Single-Stranded DNA Orchestrates an ATM-to-ATR Switch at DNA Breaks. *Molecular Cell*, 33, 547-558.
- SIGL-GLÖCKNER, J. & BRECHT, M. 2017. Polyploidy and the Cellular and Areal Diversity of Rat Cortical Layer 5 Pyramidal Neurons. *Cell Reports*, 20, 2575-2583.
- SILVA, A. R. T., SANTOS, A., FARFEL, J. M., GRINBERG, L. T., FERRETTI, R. E. L., CAMPOS, A., CUNHA, I., BEGNAMI, M., ROCHA, R. M., CARRARO, D. M., DE PEREIRA, C., JACOB-FILHO, W. & BRENTANI, H. 2014. Repair of Oxidative DNA Damage, Cell-Cycle Regulation and Neuronal Death May Influence the Clinical Manifestation of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 9.
- SIMÓN, A.-M., SCHIAPPARELLI, L., SALAZAR-COLOCHO, P., CUADRADO-TEJEDOR, M., ESCRIBANO, L., DE MATURANA, R., RÍO, J., PÉREZ-MEDIAVILLA, A. & FRECHILLA, D. 2009. Overexpression of wild-type human APP in mice causes cognitive deficits and pathological features unrelated to A $\beta$  levels. *Neurobiology of Disease*, 33, 369-378.

- SIVAPRASAD, U., MACHIDA, Y. J. & DUTTA, A. 2007. APC/C – the master controller of origin licensing? *Cell Division*, 2, 1-6.
- SMALE, G., NICHOLS, N. R., BRADY, D. R., FINCH, C. E. & HORTON, W. E. 1995. Evidence for Apoptotic Cell Death in Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology*, 133, 225-230.
- SMITH, P. D., CROCKER, S. J., JACKSON-LEWIS, V., JORDAN-SCIUTTO, K. L., HAYLEY, S., MOUNT, M. P., O'HARE, M. J., CALLAGHAN, S., SLACK, R. S., PRZEDBORSKI, S., ANISMAN, H. & PARK, D. S. 2003. Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 13650-13655.
- SONG, A.-H. H., WANG, D., CHEN, G., LI, Y., LUO, J., DUAN, S. & POO, M.-M. M. 2009. A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell*, 136, 1148-1160.
- STANDEN, C. L., BROWNLEES, J., GRIERSON, A. J., KESAVAPANY, S., LAU, K. F., MCLOUGHLIN, D. M. & MILLER, C. C. 2001. Phosphorylation of thr(668) in the cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein by stress-activated protein kinase 1b (Jun N-terminal kinase-3). *Journal of neurochemistry*, 316-320.
- STARK, G. R. & TAYLOR, W. R. 2006. Control of the G2/M transition. *Molecular Biotechnology*, 32, 227-248.
- STIMBERG, M., GOODMAN, D. F. M., BRETTE, R. & PITTÀ, M. 2017. Modeling neuron-glia interactions with the Brian 2 simulator. *bioRxiv*, 198366.
- STONE, J. G., SIEDLAK, S. L., TABATON, M., HIRANO, A., CASTELLANI, R. J., SANTOCANALE, C., PERRY, G., SMITH, M. A., ZHU, X. & LEE, H.-G. 2011. The Cell Cycle Regulator Phosphorylated Retinoblastoma Protein Is Associated With Tau Pathology in Several Tauopathies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 70, 578-587.
- SU, J. H., ANDERSON, A. J., CUMMINGS, B. J. & COTMAN, C. W. 1994. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 5, 2529.
- SU, S. C., SEO, J., PAN, J. Q., SAMUELS, B., RUDENKO, A., ERICSSON, M., NEVE, R. L., YUE, D. T. & TSAI, L.-H. 2012. Regulation of N-type Voltage-Gated Calcium Channels and Presynaptic Function by Cyclin-Dependent Kinase 5. *Neuron*, 75, 675-687.
- SU, S. C. & TSAI, L.-H. 2011. Cyclin-Dependent Kinases in Brain Development and Disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 27.
- SULLIVAN, M. & MORGAN, D. O. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8.

- SUN, X., WU, Y., GU, M., LIU, Z., MA, Y., LI, J. & ZHANG, Y. 2014. Selective filtering defect at the axon initial segment in Alzheimer's disease mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 14271-14276.
- SUZUKI, T., OISHI, M., MARSHAK, D. R., CZERNIK, A. J., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 1994. Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *The EMBO Journal*, 13, 1114-1122.
- SWARTZ, F. J. & BHATNAGAR, K. P. 1981. Are CNS neurons polyploid? A critical analysis based upon cytophotometric study of the DNA content of cerebellar and olfactory bulb neurons of the bat. *Brain Research*, 208, 267-281.
- SWIFT, H. 1953. International Review of Cytology. *International Review of Cytology*, 2, 1-76.
- TAKAHASHI, T., NOWAKOWSKI, R. S. & CAVINESS, V. S. 1995. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *Journal of Neuroscience*, 15, 6046-6057.
- TAN, Z., SUN, X., HOU, F. S., OH, H. W., HILGENBERG, L. G. W., HOL, E. M., VAN LEEUWEN, F. W., SMITH, M. A., O'DOWD, D. K. & SCHREIBER, S. S. 2007. Mutant ubiquitin found in Alzheimer's disease causes neuritic beading of mitochondria in association with neuronal degeneration. *Cell Death and Differentiation*, 14, 4402180.
- TANK, E. M. H. & TRUE, H. L. 2009. Disease-Associated Mutant Ubiquitin Causes Proteasomal Impairment and Enhances the Toxicity of Protein Aggregates. *PLoS Genetics*, 5.
- TAYLOR, W. R. & STARK, G. R. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20, 1204252.
- TERRY, R. D., MASLIAH, E., SALMON, D. P., BUTTERS, N., DETERESA, R., HILL, R., HANSEN, L. A. & KATZMAN, R. 1991. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 30, 572-580.
- THAKUR, A., SIEDLAK, S. L., JAMES, S. L., BONDA, D. J., RAO, A., WEBBER, K. M., CAMINS, A., PALLÀS, M., CASADESUS, G., LEE, H.-G., BOWSER, R., RAINA, A. K., PERRY, G., SMITH, M. A. & ZHU, X. 2008. Retinoblastoma protein phosphorylation at multiple sites is associated with neurofibrillary pathology in Alzheimer disease. *International journal of clinical and experimental pathology*, 1, 134-146.
- TONNIES, E. T. & TRUSHINA, E. 2016. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57, 1105-1121.

- TRACY, K., DIBLING, B. C., SPIKE, B. T., KNABB, J. R., SCHUMACKER, P. & MACLEOD, K. F. 2007. BNIP3 Is an RB/E2F Target Gene Required for Hypoxia-Induced Autophagy ▽  
†. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 6229-6242.
- TRUNOVA, S., BAEK, B. & GINIGER, E. 2011. Cdk5 Regulates the Size of an Axon Initial Segment-Like Compartment in Mushroom Body Neurons of the Drosophila Central Brain. *The Journal of Neuroscience*, 31, 10451-10462.
- UBERTI, D., LANNI, C., RACCHI, M., GOVONI, S. & MEMO, M. 2008. Conformationally Altered p53: A Putative Peripheral Marker for Alzheimer's Disease. *Neurodegenerative Diseases*, 5, 209-211.
- VACHER, H., YANG, J.-W., CERDA, O., AUTILLO-TOUATI, A., DARGENT, B. & TRIMMER, J. S. 2011. Cdk-mediated phosphorylation of the Kvβ2 auxiliary subunit regulates Kv1 channel axonal targeting. *The Journal of Cell Biology*, 192, 813-824.
- VARVEL, N. H., BHASKAR, K., PATIL, A. R., PIMPLIKAR, S. W., HERRUP, K. & LAMB, B. T. 2008. Aβ Oligomers Induce Neuronal Cell Cycle Events in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 28, 10786-10793.
- VINCENT, I., ROSADO, M. & DAVIES, P. 1996. Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *The Journal of cell biology*, 132.
- VITRAT, N., COHEN-SOLAL, K., PIQUE, C., COUEDIC, L. J. P., NOROL, F., LARSEN, A. K., KATZ, A., VAINCHENKER, W. & DEBILI, N. 1998. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood*, 91, 3711-3723.
- WAKABAYASHI, K., HONER, W. G. & MASLIAH, E. 1994. Synapse alterations in the hippocampal-entorhinal formation in Alzheimer's disease with and without Lewy body disease. *Brain Research*, 667, 24-32.
- WALTON, C., ZHANG, W., PATIÑO-PARRADO, I., BARRIO-ALONSO, E., GARRIDO, J.-J. & FRADE, J. 2018. Primary neurons can enter M-phase. *bioRxiv*, 288589.
- WANG, X., WANG, W., LI, L., PERRY, G., LEE, H.-G. & ZHU, X. 2014. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842, 1240-1247.
- WANG, Y., GU, Q., MAO, F., HAUGLAND, R. P. & CYNADER 1994. Activity-dependent expression and distribution of M1 muscarinic ACh receptors in visual cortex neuronal cultures. *Journal of Neuroscience*, 14, 4147-4158.

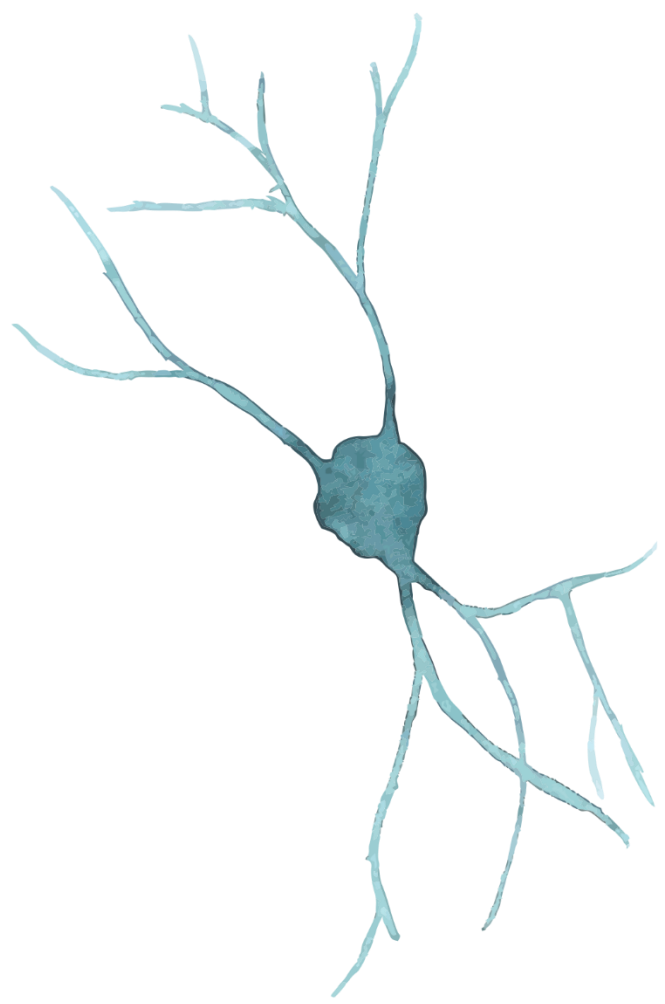
- WELCKER, M. & CLURMAN, B. E. 2005. The SV40 Large T Antigen Contains a Decoy Phosphodegron That Mediates Its Interactions with Fbw7/hCdc4. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 7654-7658.
- WINCKLER, B., FORSCHER, P. & MELLMAN, I. 1999. A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature*, 397, 698-701.
- WLODARCHAK, N. & XING, Y. 2016. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 51, 162-184.
- XU, Q., ZHU, S., WANG, W., ZHANG, X., OLD, W., AHN, N. & LIU, X. 2009. Regulation of Kinetochore Recruitment of Two Essential Mitotic Spindle Checkpoint Proteins by Mps1 Phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 10-20.
- YANG, Y., GELDMACHER, D. S. & HERRUP, K. 2001. DNA Replication Precedes Neuronal Cell Death in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 21, 2661-2668.
- YANG, Y., LACAS-GERVAIS, S., MOREST, K. D., SOLIMENA, M. & RASBAND, M. N. 2004.  $\beta$ IV Spectrins Are Essential for Membrane Stability and the Molecular Organization of Nodes of Ranvier. *The Journal of Neuroscience*, 24, 7230-7240.
- YANG, Y., MUFSON, E. J. & HERRUP, K. 2003. Neuronal Cell Death Is Preceded by Cell Cycle Events at All Stages of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 23, 2557-2563.
- ZANET, J., FREIJE, A., RUIZ, M., COULON, V., SANZ, R. J., CHIESA, J. & GANDARILLAS, A. 2010. A Mitosis Block Links Active Cell Cycle with Human Epidermal Differentiation and Results in Endoreplication. *PLoS ONE*, 5.
- ZHOU, D., LAMBERT, S., MALEN, P. L., CARPENTER, S., BOLAND, L. M. & BENNETT, V. 1998. AnkyrinG Is Required for Clustering of Voltage-gated Na Channels at Axon Initial Segments and for Normal Action Potential Firing. *The Journal of Cell Biology*, 143, 1295-1304.
- ZHOU, Z., HE, M., SHAH, A. A. & WAN, Y. 2016. Insights into APC/C: from cellular function to diseases and therapeutics. *Cell Division*, 11, 9.
- ZHU, X., LEE, H.-G., PERRY, G. & SMITH, M. A. 2007. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772, 494-502.
- ZHU, X., SIEDLAK, S. L., WANG, Y., PERRY, G., CASTELLANI, R. J., COHEN, M. L. & SMITH, M. A. 2008. Neuronal binucleation in Alzheimer disease hippocampus. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34, 457-465.

ZIELKE, N., QUERINGS, S., ROTTIG, C., LEHNER, C. & SPRENGER, F. 2008. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes & Development*, 22, 1690-1703.









**ANEXOS**



**Anexo I:** Código modelo neuronal de hiperploidización.

**Anexo II:** Resultados complementarios modelo neuronal hiperploidización.

**Anexo III:** Tabla estadística.

**Anexo IV:** Primera fase en el desarrollo de un modelo murino de reactivación de ciclo celular en neuronas.

**Anexo V:** Artículo de investigación.

BARRIO-ALONSO, E., HERNÁNDEZ-VIVANCO, A., WALTON, C. C., PEREA, G. & FRADE, J. M. 2018. Cell cycle reentry triggers hyperploidization and synaptic dysfunction followed by delayed cell death in differentiated cortical neurons. Scientific Reports, 8, 14316.

## ANEXO I

```
#####

##### HIPERPLOIDY_MODEL V1 #####

#####

# loading packages

from brian2 import *

%matplotlib inline

from brian2tools import *

import numpy, random, warnings, time, os

import pandas as pd

warnings.filterwarnings('ignore')

start_scope()

# Damage network

Prob_tet = 0.8 # percentage of non-spiking cells (over size network,
independent of type)

Cell_tet = 'all' # all, lead, exc, inh

no_syn = False # No synapsis


# Parameters to play with

N = 4000 # Network size

dur = 1 # simulation duration, in seconds


taum_e = 20*ms # membrane time constant
taum_i = 9*ms # membrane time constant (not 10, because eqs does 0)


Perc_inh = .1 # percentage of inhibitory neurons
Perc_lead = .05 # percentage of leader neurons


prob_Ce = 0.1 # excitatory connection probability
prob_Ci = 0.2 # inhihibitory connection probability
```

```

prob_C1 = 0.1 # leader connection probability

we = 2*mV # excitatory synaptic weight (voltage)
wi = -9*mV # inhibitory synaptic weight

El_h = -49*mV # membrane potential, for all neurons
El_l = -46*mV # membrane potential, for leaders

# Network parameters

taue = 5*ms # excitation time constant
taui = 10*ms # inhibition time constant
Vt = -50*mV # spike threshold
Vr = -55*mV # reset threshold

# Internal variables

Exc_sz = int(N - (N * Perc_inh)) # Size of excitatory population
Leader_sz = int(N * Perc_lead) # Size of leadership population
Dam_sz = int(N*Prob_tet) # Size of damage population (non-spiking
cells)

if no_syn:
    prob_Ce = 0
    prob_Ci = 0
    prob_Cl = 0

eqs = '''
dv/dt = (ge+gi-(v-El-dam))/tau : volt (unless refractory)
dge/dt = -ge/taue : volt
dgi/dt = -gi/taui : volt
tau : second
El : volt
dam : volt
'''

```

```

P = NeuronGroup(N, eqs, threshold='v>Vt', reset='v = Vr',
refractory=5*ms,method='exact')

P.v = 'Vr + rand() * (Vt - Vr)' # initial v, random bet -60 to -50

P.ge = 0*mV # initial G on 0

P.gi = 0*mV

P.tau[:Exc_sz] = taum_e # tau for excitatory neurons
P.tau[Exc_sz:] = taum_i # tau for inhibitory neurons

P.El = El_h

P.El[:Leader_sz] = El_l # membrane potential for leaders

P.dam = 0 # damage parameter set as 0 for all neurons

# damage

if Prob_hip == 0:
    print('Control hipModel')
    damp_pop = [] # damage population
    Cell_hip = 'Control'
    code = 0
elif Cell_hip is 'all':
    damp_pop = random.sample(list(range(N)),Dam_sz)
    print('{0}%hiperploids cells, entire
population'.format(Prob_hip*100))
    code = 1
elif Cell_hip is 'lead':
    if Dam_sz > Leader_sz: Dam_sz = Leader_sz # taking care of sizes
    damp_pop = random.sample(list(range(Leader_sz)),Dam_sz)
    print('{0}%hiperploids leader cells,
'.format(Dam_sz/Leader_sz*100))
    code = 2
elif Cell_hip is 'exc':
    if Dam_sz > Exc_sz: Dam_sz = Exc_sz # taking care of sizes
    damp_pop = random.sample(list(range(Exc_sz)),Dam_sz)
    print('{0}%hiperploids exc cells'.format(Dam_sz/Exc_sz*100))
    code = 3
elif Cell_hip is 'inh':
    if Dam_sz > N - Exc_sz: Dam_sz = N - Exc_sz # taking care of sizes
    damp_pop = random.sample(list(range(Exc_sz,N,1)),Dam_sz)

```

```

print('{0}%hiperploids inh cells'.format(Dam_sz/(N - Exc_sz)*100))

code = 4

if len(damp_pop)>0: P.dam[damp_pop] = -30*mV # implement damage

Ce = Synapses(P, P, on_pre='ge += we') # Definition of an excitatory
synapsis

Ci = Synapses(P, P, on_pre='gi += wi') # Definition of an inhibitory
synapsis

Cl = Synapses(P, P, on_pre='ge += we') # Definition of an excitatory
leader neuron synapsis

Ce.connect(condition='i<Exc_sz', p=prob_Ce) # Excitatory synapsis from
definition, to all cells

Ci.connect(condition='i>=Exc_sz', p=prob_Ci) # Inhibitory synapsis
from definition, to all cells

Cl.connect(condition='i<Leader_sz',p=prob_Cl) # Leader synapsis from
definition, to all cells

spk_mon = SpikeMonitor(P)

state_mon = StateMonitor(P, 'v', record=True) # record three cells

print('HipRunning...')

run(dur * second)

print('HipDone!')

# Inspect simulation

f1=figure(figsize=(10, 4)) # Plotting raster

plot(spk_mon.t[numpy.where(spk_mon.i<Exc_sz)[0]]/ms,
spk_mon.i[numpy.where(spk_mon.i<Exc_sz)[0]], ',b') # blue are exc

plot(spk_mon.t[numpy.where(spk_mon.i<Leader_sz)[0]]/ms,
spk_mon.i[numpy.where(spk_mon.i<Leader_sz)[0]], ',g') # green are lead

plot(spk_mon.t[numpy.where(spk_mon.i>=Exc_sz)[0]]/ms,
spk_mon.i[numpy.where(spk_mon.i>=Exc_sz)[0]], ',r') # red are inh

plot([-10]*len(damp_pop),damp_pop, ',k')

xlabel('Time [ms]'), ylabel('Neuron index'), xlim(-50,dur*1000 + 50),
ylim(0-200, 4000+200)

```

```

print('Firing rate of Exc Lead:
{0}'.format(len(spik_mon.t[numpy.where(spik_mon.i<Leader_sz)[0]])/Leader_
_sz/dur))

print('Firing rate of Exc:
{0}'.format(len(spik_mon.t[numpy.where(spik_mon.i<Exc_sz)[0]])/Exc_sz/du
r))

print('Firing rate of Inh:
{0}'.format(len(spik_mon.t[numpy.where(spik_mon.i>=Exc_sz)[0]])/(N-
Exc_sz)/dur))

f2=figure(figsize=(10, 4)) # Plotting some traces
for ii in random.sample(list(range(Exc_sz)),3): # plotting some exc
    plot(state_mon[ii].t/ms, state_mon.v[ii].T, 'b')
for ii in random.sample(list(range(Exc_sz,N,1)),3): # plotting some
exc
    plot(state_mon[ii].t/ms, state_mon.v[ii].T, 'r')
xlabel('Time [ms]'), xlim(-50,dur*1000 + 50), ylabel('mV')
print('HipSaving...')

sim_name = 'tetSim ' + Cell_tet + '_' + time.asctime() # Simulation
name

sim_name = sim_name.replace(' ','_')
sim_name = sim_name.replace(':', '_')

os.mkdir(sim_name) # creating simulation folder

spk = pd.DataFrame([list(spik_mon.i), list(spik_mon.t/ms)]) # saving
spikes

spk.to_csv(sim_name + '/spk.csv', sep=',', encoding='utf-8',
index=False, header=False)

mv = pd.DataFrame(column_stack((transpose(state_mon.v/mV),
state_mon.t))) # saving membrane potential

mv.to_csv(sim_name + '/mv.csv', sep=',', encoding='utf-8',
index=False, header=False)

feat = {'N': [N], 'dur':[dur], 'taum_e':[taum_e/ms],
'taum_i':[taum_i/ms], 'Perc_inh':[Perc_inh],
        'Perc_lead':[Perc_lead], 'prob_Ce':[prob_Ce],
'prob_Ci':[prob_Ci], 'prob_Cl':[prob_Cl], 'we':[we/mvolt],

```



```

        'wi':[wi/mvolt], 'El_h':[El_h/mV],
'El_l':[El_l/mV], 'Perc_dam':[Prob_hip], 'type_dam':[code],
'taue':[taue/ms],

        'taui':[taui/ms], 'Vt':[Vt/mV], 'Vr':[Vr/mV]} # saving
simulation parameters

feat = pd.DataFrame.from_dict(feat)

feat.to_csv(sim_name + '/feat.csv', sep=',', encoding='utf-8',
index=False)


cellType_log = array([0] * N) # creating cell log, 0 is excitatory
cell

cellType_log[:Leader_sz] = 1 # 1 is leader

cellType_log[Exc_sz:] = 2 # 2 is inh


hip_log = array([0] * N) # creating hip log, 0 is healthy cell

hip_log[damp_pop] = 1 # 1 is hip


log = pd.DataFrame(column_stack((cellType_log,
tet_log)), columns=['cellType', 'Tet'])

log.to_csv(sim_name + '/log.csv', sep=',', encoding='utf-8',
index=False)


f1.savefig(sim_name + '/raster.png') # Saving figures

f2.savefig(sim_name + '/SomeTraces.png')

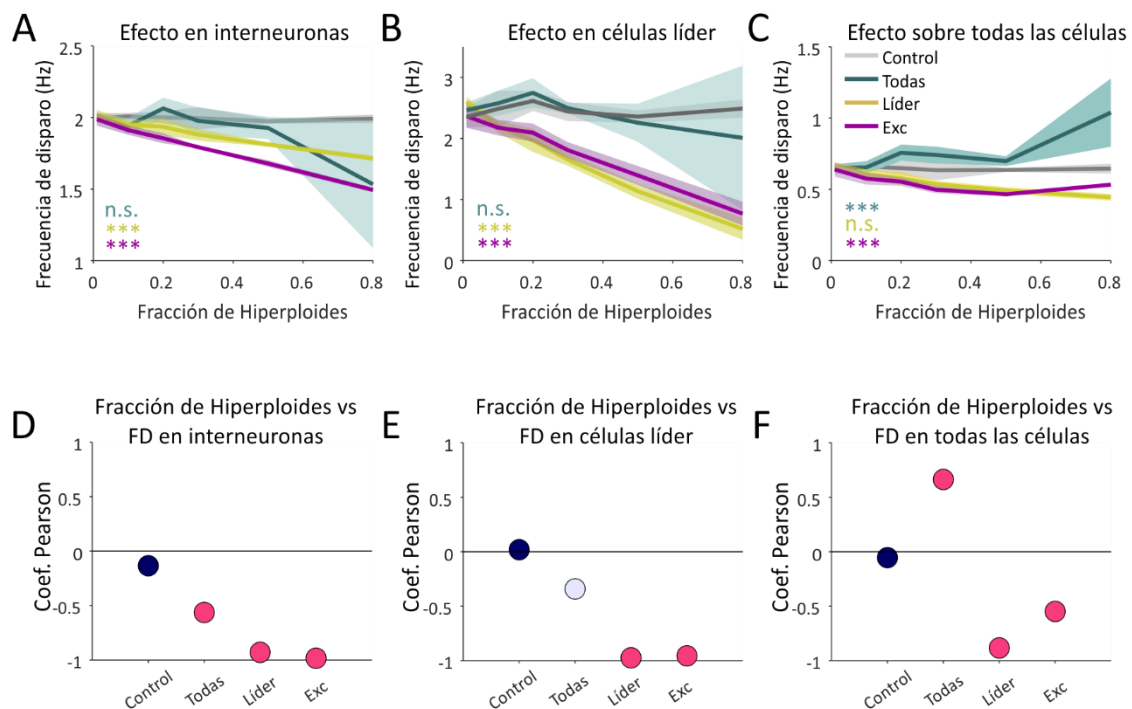

print('TetSaved. Thanks for using HipModel v1.')

```

## ANEXO II

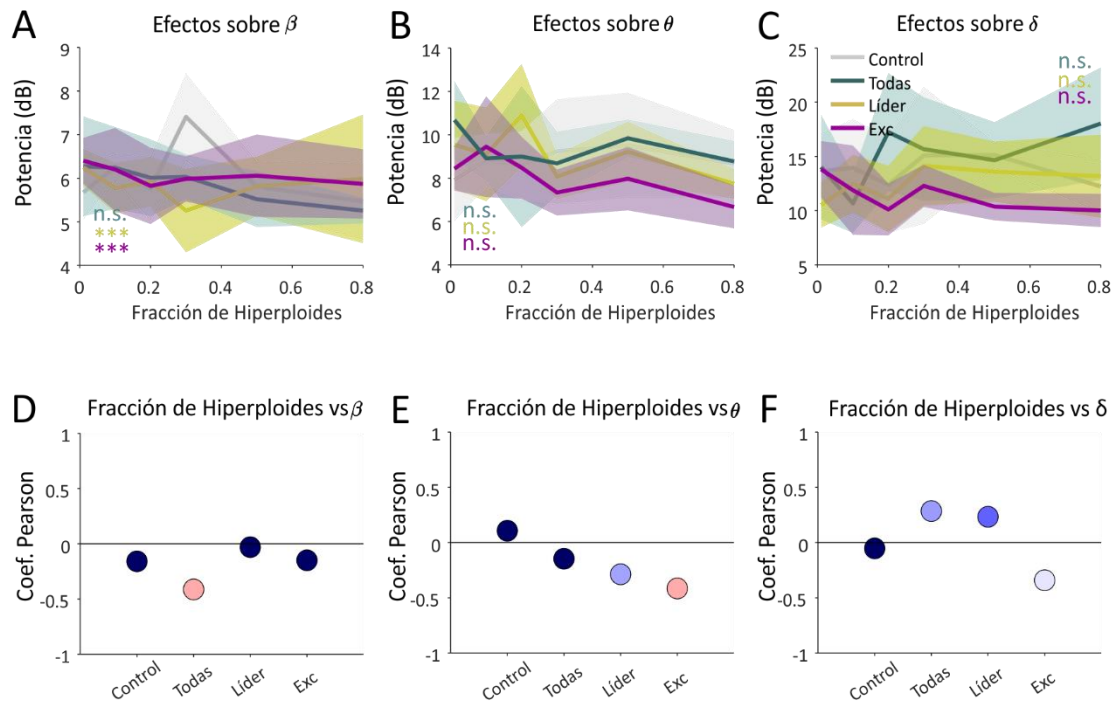
Se obtuvieron efectos similares a los de la **Fig. 34** en el caso del silenciamiento de las tres subpoblaciones sobre la población global, de interneuronas y líderes (**Fig. 36 Anexo II**). En el caso de las dos últimas subpoblaciones el aumento del porcentaje de silenciamiento en neuronas al azar de toda la red global provoca una disminución de la frecuencia de disparo de estas dos poblaciones. Siendo en el caso de las interneuronas una correlación significativa mientras que no lo es en el caso de la población líder.

En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de un efecto diferencial de la presencia de neuronas hiperploidias (silenciadas) sobre las distintas poblaciones neuronales, en función de la fracción de silenciamiento y del distinto comportamiento de la red cuando esta pérdida funcional está presente en un grupo u en otro de neuronas.



Si se analizan el resto de las bandas espectrales no observamos efectos significativos en general. Cuando se ejerce el silenciamiento sobre la población total, hay una correlación débil pero negativa con la potencia de *beta* (**Fig. 37 A Anexo II**). Lo mismo ocurre en *theta* cuando se aumenta el porcentaje de silenciamiento en la subpoblación de las neuronas excitatorias (**Fig. 37 E Anexo II**). No se observan efectos significativos en *delta* (**Fig. 37 F Anexo II**).

Estos resultados sugieren, de nuevo, un comportamiento espectral muy variable ante una perturbación de la red.



**Figura 37. Efecto de la presencia de neuronas hiperploides sobre de las distintas poblaciones en las oscilaciones.** Las gráficas muestran cómo se ve afectada la actividad de beta (B), theta (C) o delta (D) cuando se va aumentando el porcentaje de neuronas hiperploides (silentes) en todas las neuronas (verde), en las líder (amarillo) o en las excitatorias (morado). La línea gris muestra la potencia (dB) media de esta oscilación de la población cuando no hay silenciamiento de neuronas. Se muestran los intervalos de confianza del 95 % para cada línea. (D-F) Correlaciones de Pearson, tal y como en la figura 36. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## ANEXO III

FIGURA	COMPARACIÓN	ESTADÍSTICO	DATOS
<b>Figura 18</b>	0-3 vs 2-3 0-4 vs 2-4 0-4 vs 3-4	Test t de Student (dos colas)	t(6)=6.285, p<0.001 t(5)=4.544, p=0.006 t(6)=7.494, p<0.001
<b>Figura 22</b>	LacZ vs TAg vs K1	Anova de tres vías	Días: F(3,59)=36.91, p<0.001; Tipo transfectado: F(2,59)=14.61, p<0.001; Interacción: F(6,59)=4.18, p<0.01
<b>Figura 26 H</b>	8 DIV vs 10 DIV 8 DIV vs 14 DIV	Test de Mann-Whitney rank sum	t(23)=4.199, p=0.026 t(24)=3.379, p=0.007
<b>Figura 28 C</b>	LacZ vs TAg	Anova de dos vías	Corriente: F(7,245)=6.011, p<0.001; Tipo transfectado: F(1,245)=3.559, p=0.067; Interacción: F(7,245)=6.53, p<0.001
<b>Figura 28 D</b>	Control vs TAg LacZ vs TAg	Test de Mann-Whitney rank sum	t(24)=3.764, p=0.003 t(35)=3.954, p<0.001
<b>Figura 28 E</b>	Control vs Tag LacZ vs TAG	Test de Mann-Whitney rank sum	t(9)=-2.872, p=0.024 t(17)=-2.0017, p= 0.031
<b>Figura 29 C</b>	LacZ vs TAg	Anova de dos vías	Corriente: F(7,168)=0.6555, p=0.709, Tipo transfectado: F(1,24)=21.24, p<0.001, Interacción: F(7,168)=0.5492, p=0.796
<b>Figura 29 H</b>	Control vs Tag LacZ vs Tag K1 vs TAG	Test de Mann-Whitney rank sum	t(16)=3.612, p= 0.016 t(26)=2.620, p= 0.009 t(19)=3.554, p<0.001
<b>Figura 29 I</b>	Control vs Tag LacZ vs Tag K1 vs TAG	Test de Mann-Whitney rank sum	t(7)=5.363, p=0.016 t(14)=1.912, p =0.009 t(11)=3.163, p=0.002
<b>Figura 29 J</b>	Control vs Tag LacZ vs Tag K1 vs TAG	Test de Mann-Whitney rank sum	t(10)=3.628, p=0.004 t(22)=1.727, p=0.003 t(15)=1.701, p=0.018
<b>Figura 30 A</b>	LacZ vs Tag K1 vs TAG	Test de Mann-Whitney rank sum	t(82)=6,661, p<0.001 t(104)=6.149, p<0.001

<b>Figura 30 C</b>	LacZ vs Tag K1 vs TAg	Test de Mann-Whitney rank sum	t(82)=2.993, p=0.003 t(104)=3.576, p<0.001
<b>Figura 30 B</b>	LacZ vs Tag	Test de Mann-Whitney rank sum	t(72)=8.259, p<0.001
<b>Figura 30 D</b>	LacZ vs Tag	Test de Mann-Whitney rank sum	t(72)=5.098, p<0.001
<b>Figura 32 B</b>	LacZ -KCl vs TAg -KCl LacZ -KCl vs LacZ +KCl	Test t de Student (dos colas)	t(105)=5.093, p<0.001 t(86)=3.276, p=0.002
<b>Figura 32 H</b>	LacZ -KCl vs LacZ +KCl	Test de Mann-Whitney rank sum	t(27)=1.697, p=0.002
<b>Figura 32 I</b>	LacZ -KCl vs LacZ +KCl	Test de Mann-Whitney rank sum	t(31)=1.967, p=0.038
<b>Figura 32 C</b>	TAg +KCl vs TAg +KCl	Test t de Student (dos colas)	t(2)=-7.280, p=0.018
<b>Figura 34 A</b>	Efecto en las excitatorias	Anova de dos vías (medidas repetidas)	Tipo de subpoblación: F(3,116)=28,29, p<0.001; Porcentaje de hiperploidía: F(1,116)=4,35, p=0.0393
<b>Figura 34 B</b>	Efecto en las excitatorias	Correlación de Pearson	All (R=0,784) Exc (R=-0,657) Líder (R=-0,948)
<b>Figura 35 A</b>	Efecto en gamma	Anova de dos vías (medidas repetidas)	Tipo de subpoblación: F(3,116)=3, p=0,033; Porcentaje de hiperploidía: F(1,116)=32,4, p<0,001
<b>Figura 35 B</b>	Efecto en gamma	Correlación de Pearson	All (R=-0,859) Exc (R=-0,141) Líder (R=-0,444)

<b>Figura 36 A-C</b>	Efecto en las interneuronas		Tipo de subpoblación: F(3,116)=17,06, p<0.001; Porcentaje de hiperploidia: F(1,116)=45,91, p<0.001
	Efecto en las líder	Anova de dos vías (medidas repetidas)	Tipo de subpoblación: F(3,116)=25,21, p<0.001; Porcentaje de hiperploidia: F(1,116)=16,51, p<0.001
	Efecto en la población total		Tipo de subpoblación: F(3,116)=23,05, p<0.001; Porcentaje de hiperploidia: F(1,116)=7,92, p=0,0057
<b>Figura 36 D-F</b>	Efecto en las interneuronas		All (R=-0,563) Exc (R=-0,928) Líder (R=-0,983)
	Efecto en las líder	Correlación de Pearson	All (R=-0,340) Exc (R=-0,973) Líder (R=-0,955)
	Efecto en la población total		All (R=0,663) Exc (R=-0,882) Líder (R=-0,547)
<b>Figura 37 A-C</b>	Efecto en beta		Tipo de subpoblación: F(3,116)=0,9, p=0,444; Porcentaje de hiperploidia: F(1,116)=1,78, p=0,185
	Efecto en theta	Anova de dos vías (medidas repetidas)	Tipo de subpoblación: F(3,116)=2,24, p=0,087; Porcentaje de hiperploidia: F(1,116)=1,51, p=0,222
	Efecto en delta		Tipo de subpoblación: F(3,116)=4,02, p=0,009; Porcentaje de hiperploidia: F(1,116)=0,06, p=0,803
<b>Figura 37 D-F</b>	Efecto en beta		All (R=-0,413) Exc (R=-0,030) Líder (R=-0,149)
	Efecto en theta	Correlación de Pearson	All (R=-0,145) Exc (R=-0,286) Líder (R=-0,414)
	Efecto en delta		All (R=0,285) Exc (R=0,233) Líder (R=-0,340)

## ANEXO IV

### Primera fase en el desarrollo de un modelo murino de reactivación de ciclo en neuronas

El objetivo de esta parte de la tesis es determinar si es posible producir una reentrada en ciclo celular en neuronas adultas *in vivo* y, para ello, utilizaremos un modelo murino. De esta forma, podríamos tener disponible una herramienta que permitiría el estudio del impacto funcional de la reactivación de ciclo como modelo de AD. Como pasos preliminares, se generaron partículas lentivirales que contienen la secuencia TAg y luego se llevó a cabo su transducción en neuronas corticales murinas *in vitro*. Por último, se llevará a cabo la inyección de estas partículas en la corteza entorrinal de ratones adultos y se analizarán los efectos de la reactivación de ciclo en el cerebro adulto en un futuro.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la línea celular HEK293Ta procedente de Genecopoeia (#CLV-PK-01) que se cultivó en medio DMEM 10 % FBS 0,5 % P/S una semana antes de realizar la transfección.

El día de antes de la transfección, las células HEK293Ta se siembran en placas p100 previamente tratadas con poli-ornitina (0,01 mg/ml) a una densidad de  $4 \times 10^6$  por placa en medio DMEM 10 % FBS sin P/S. Se utilizaron 6 placas p100 por cada empaquetamiento. Para la transfección se prepara 2,5  $\mu$ g de plásmido lentiviral con 5  $\mu$ l de Lenti-pac HIV mix (0,5  $\mu$ g/  $\mu$ l, Genecopoeia #LT001) en 200  $\mu$ l de Opti-MEM (Invitrogen) y por otro lado, 15  $\mu$ l de Endofectin Lenti (Genecopoeia #LT001). Se mezclan los volúmenes y se incuban a temperatura ambiente durante 10-25 minutos para que se formen los complejos de ADN-endofectamina (ratio final 3 Endofectin Lenti: 1 plásmido). A continuación, se añade la mezcla directamente a las células. Se incuban las células a 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> durante 8-14 horas. Pasado ese tiempo se aspira el medio y se añade nuevo DMEM 5 % FBS añadiendo 1/500 de volumen de TiterBoost (1X, Genecopoeia) para aumentar el rendimiento de la transfección. Tras 24 horas se recoge el medio y se añade nuevo para seguir cultivando. Se realizan otras dos recogidas de medio a las 36 y 48 horas. A continuación todo el medio recogido se centrifuga levemente a 1000 rpm durante 5 min para eliminar los restos celulares. Después, se filtra con filtros PES (*polyethersulfone*) de 0,45  $\mu$ m de *low-protein binding* (Merck). Entonces, el sobrenadante se reparte a tubos de ultracentrífuga Beckman y se ultracentrifuga 2 horas a 20.000 rpm a 16 °C. Por último, se descarta el sobrenadante y el

pellet que queda se resuspende bien en neurobasal (para transducción *in vitro*) o en PBS (para inyecciones *in vivo*).

Una vez obtenidas las partículas lentivirales, se produce la transducción *in vitro* de neuronas corticales de ratón que se realiza 1 día después del plaqueo del cultivo (sembrado a 85.000 células/cubre) para asegurar la eficiencia. Las neuronas se cultivan con los lentivirus durante 12 DIV hasta el momento de la fijación.

Para la estimación del título lentiviral, puesto que se trabajaba con un promotor neuronal, y por lo tanto, no expresado en ninguna línea celular de la que extraer el título, se realizó una estimación haciendo un recuento total del número de células NeuN+/GFP+ o NeuN+/TAg+, utilizando el mismo método explicado en el apartado de Análisis de imagen y recuento de neuronas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **La transducción lentiviral del antígeno TAg bajo el promotor de sinapsina I induce reentrada en ciclo *in vitro***

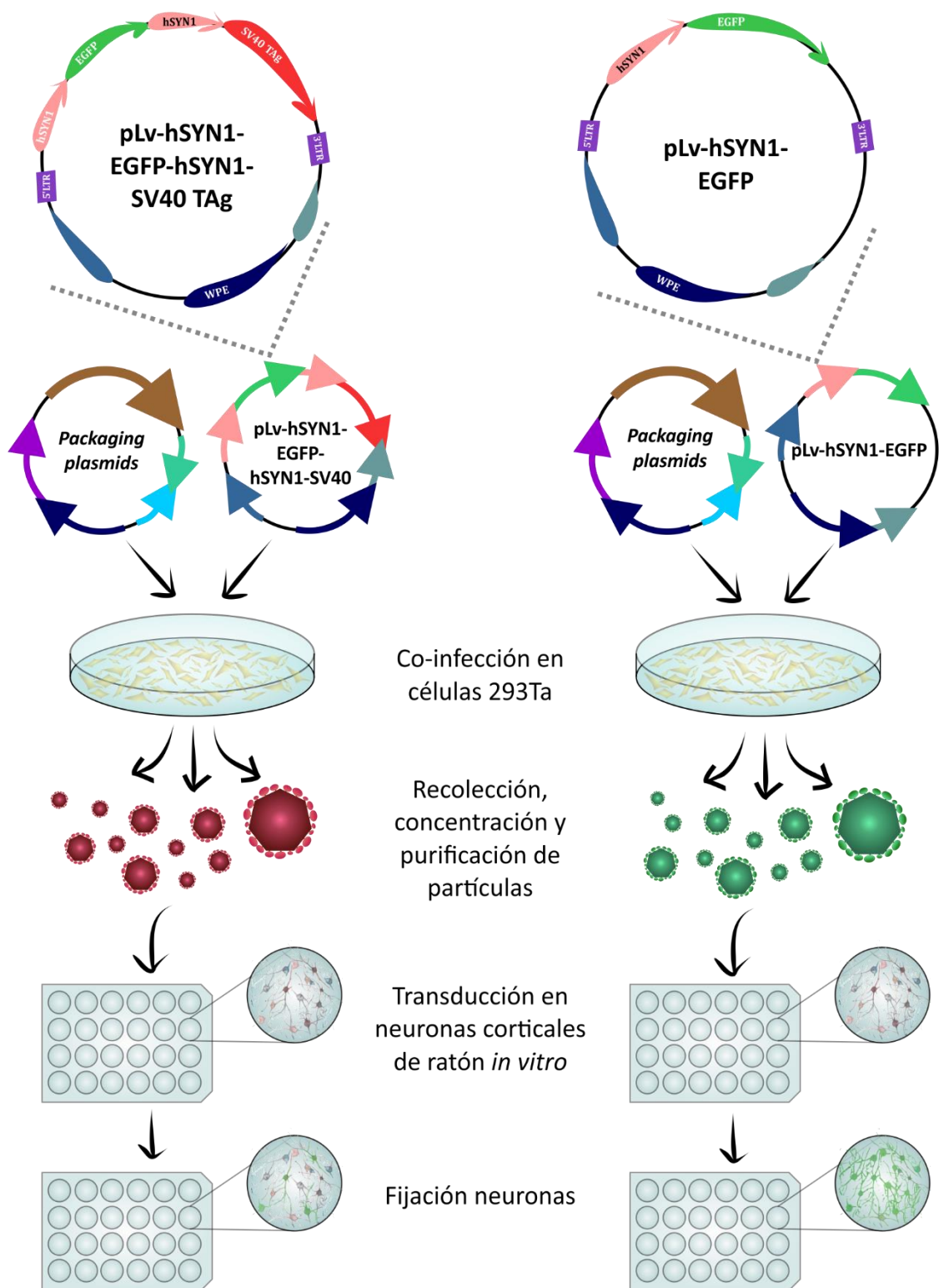
Basándonos en numerosas investigaciones en las que se han encontrado reguladores de ciclo celular presente en cerebros de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Smith et al., 2003, Esteras et al., 2014, Ranganathan and Bowser, 2003, Hayashi et al., 2000), junto con nuestros resultados previos, decidimos realizar un estudio para determinar si la reentrada en ciclo forzada afecta a las neuronas maduras en el cerebro *in vivo*. De manera similar a como se realizó en el estudio de Park y colaboradores 2007 (Park et al., 2007), en el cual se utilizaron ratones transgénicos en los que TAg se expresaba de manera inducible por la secuencia operadora tet (del sistema Tet-off) bajo el promotor genérico CaM quinasa II alfa, nosotros generamos lentivirus que contienen la secuencia del TAg para reactivar ciclo en neuronas *in vivo*. El lentivirus TAg tiene la secuencia del antígeno *large T* bajo el promotor del gen de sinapsina I (proteína expresada en neuronas cuya función es, entre otras, la unión a proteínas del citoesqueleto y a las pequeñas vesículas sinápticas en los terminales axónicos), coexpresado con la proteína reportera GFP usando el mismo promotor. Por otro lado, también generamos lentivirus control conteniendo la secuencia del gen de la proteína reportera GFP, también bajo el control del promotor de sinapsina I (Fig. 38).

En primer lugar, determinamos la eficiencia y capacidad de infección de los lentivirus *in vitro* para su posterior uso *in vivo*. Los experimentos *in vivo* no han podido ser incluidos en este trabajo escrito al ser experimentos de larga duración.



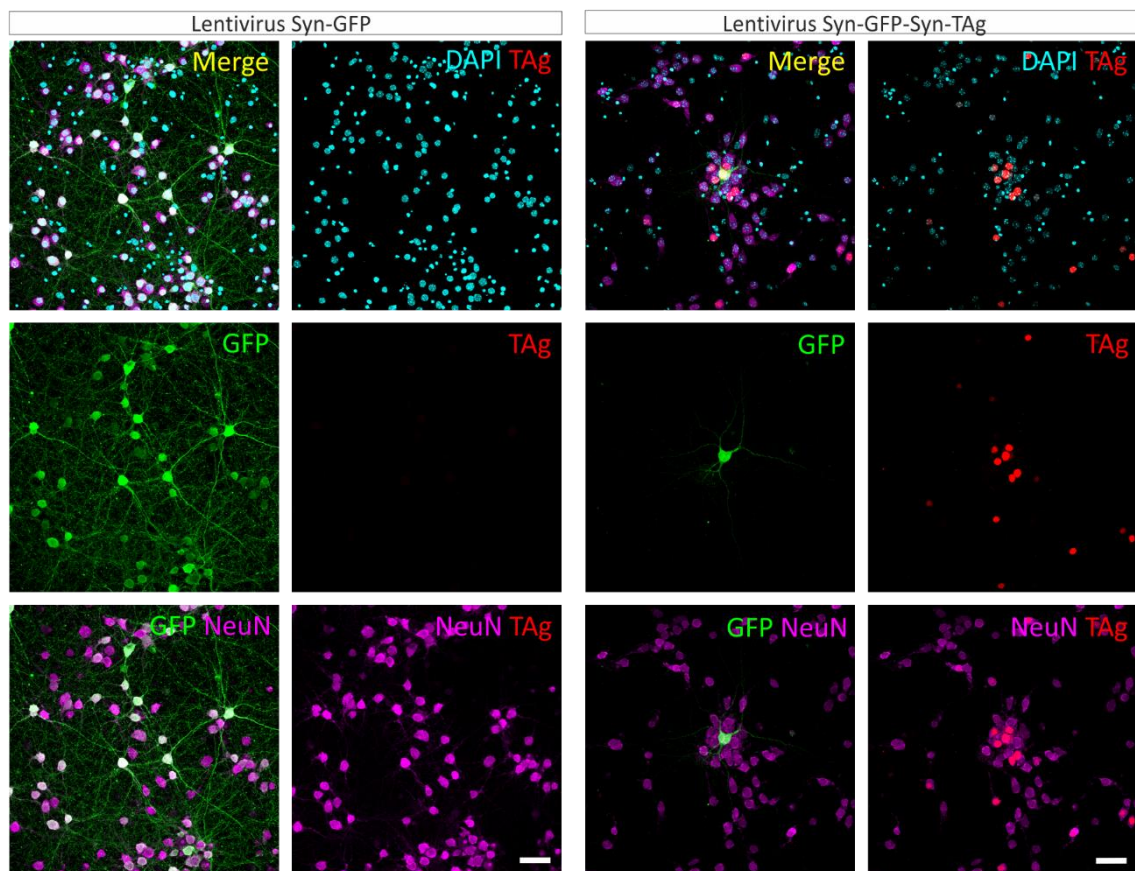
Los lentivirus se añadieron en concentración de 5  $\mu$ l/pocillo a los cultivos de neuronas al día siguiente de plaquear las neuronas en cultivo (1 DIV). Se mantuvieron durante 12 DIV y después de fijarlas se analizó la presencia de expresión de TAg y del reportero GFP. En el caso de las neuronas transducidas con los lentivirus TAg, se obtuvieron unos rendimientos de infección medidos como porcentaje de neuronas con marcaje TAg del 14,45 %  $\pm$  1,35 para el empaquetamiento I y 28,22 %  $\pm$  3,15 para el empaquetamiento II (n=16830 neuronas en empaquetamiento I y n=25381 neuronas para empaquetamiento II) (**Fig. 39**). Se observó que las neuronas transducidas con el lentivirus TAg expresaban con mayor frecuencia la proteína TAg que el GFP, asumimos que como consecuencia del carácter bicistrónico de la construcción génica. Este reportero tuvo una eficiencia de expresión muy baja en comparación: 1,12 %  $\pm$  0,14 para el empaquetamiento I y 2,96 %  $\pm$  0,50 para el empaquetamiento II. Se comprobó así mismo que todas las células que expresaban tanto TAg como GFP eran NeuN positivas, confirmándose así la especificidad neuronal del promotor de sinapsina I. En el caso de las neuronas transducidas con los lentivirus control, la eficiencia de infección fue mucho mayor: para el empaquetamiento I, el porcentaje de neuronas GFP fue del 47 %  $\pm$  0,29 y para el empaquetamiento II el porcentaje fue un 62,19 %  $\pm$  1,29 (n=51502 neuronas en empaquetamiento I y n=39810 neuronas para empaquetamiento II). La **Fig. 39** muestra las diferencias en la eficiencia de expresión de la proteína reporter GFP. Por último, durante este análisis observamos ejemplos de neuronas TAg positivas con núcleos grandes o binucleadas. Esta observación nos indica que TAg ha inducido la reentrada en el ciclo en estas neuronas a través de este sistema lentiviral, lo cual no se observa en las neuronas transducidas con el lentivirus control (**Fig. 40** paneles A y B).

En nuestros estudios *in vivo*, esperamos encontrar un aumento de hiperploidía en una población reducida de neuronas en la corteza entorrinal, ya que la expresión del antígeno TAg no es generalizada, a diferencia de lo que muestra el trabajo de Park y colaboradores. Además, junto con este aumento, un deterioro tanto en la morfología sináptica como en la funcionalidad de la célula, lo cual confirmaría nuestros resultados *in vitro*. Por último, se esperaría encontrar la presencia de ovillos neurofibrilares y placas de beta amiloide, de forma similar a lo descrito en el mismo trabajo. De ser así, la inducción de la reentrada en ciclo e hiperploidización de neuronas maduras mediante la expresión forzada del TAg del SV40 podría proporcionar un nuevo modelo animal para el estudio de la relación de la reactivación de ciclo en neuronas y la disfuncionalidad a nivel sináptico. Todo esto podría llevar a un deterioro cognitivo a largo plazo, y por tanto al desarrollo, también, de un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

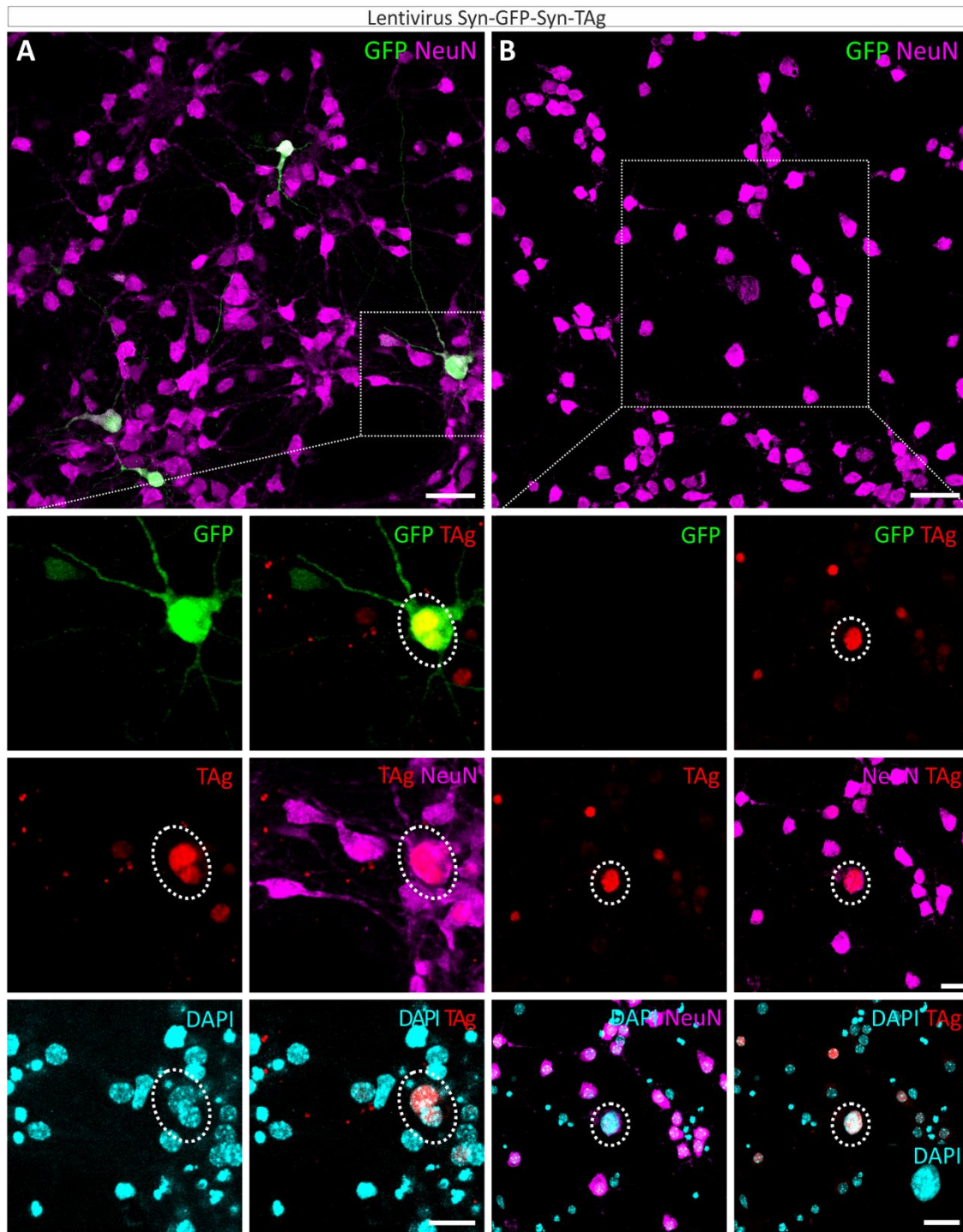


**Figura 38. Esquema experimento empaquetamiento lentivirus TAg y Control y transducción en neuronas corticales de ratón *in vitro*.** Los plásmidos lentivirales contienen las secuencias LTR, acotando las secuencias a integrar, necesarias para introducirse en el empaquetamiento. Estos plásmidos lentivirales se co-transfectan en células HEK293Ta con un conjunto de plásmidos que contienen las secuencias pol, gag y rev imprescindibles para el empaquetamiento, replicación y transducción de los lentivirus. Las partículas lentivirales finales tienen carácter no replicativo puesto que los genes anteriores no están presentes en el genoma viral empaquetado (los plásmidos no

contienen señal de empaquetamiento). Se transducen neuronas corticales de ratón 1 día después del cultivo con los lentivirus, una vez concentrados y purificados. Estas neuronas se fijaron después de 12 días de cultivo para su posterior análisis.



**Figura 39. La eficiencia de transducción del lentivirus control es mayor que la del lentivirus TAg.** (A) Construcción de los plásmidos lentivirales Control (pLV -hSyn1-EGFP) y TAg (pLV- hSyn1-EGFP- hSyn1-SV40 TAg). (B) El lentivirus Control tiene un mayor rendimiento en la transducción y expresión de la proteína GFP en comparación con el lentivirus TAg tal cual se muestra en los paneles de imágenes representativas de confocal. Escala 40  $\mu$ m.



**Figura 40. Neuronas corticales transducidas con lentivirus TAg muestran núcleos hiperplóides a los 12 DIV.** Los paneles A y B muestran dos imágenes representativas de proyecciones de confocal de neuronas transducidas que muestran expresión de TAg (rojo). En A se muestra una neurona binucleada, ejemplo de la inducción de ciclo por parte del lentivirus TAg. El panel B muestra una neurona que a pesar de ser TAg positiva es, sin embargo, GFP negativa, debido a la diferencia de expresión de este gen respecto al primero. Asimismo se muestra una ampliación del núcleo de la neurona TAg positiva central que posee mayor tamaño que las demás, indicando, de nuevo, reentrada en ciclo. Escala 40  $\mu$ m para imagen de GFP NeuN y 20  $\mu$ m para el resto de las imágenes.